

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ALINE SILVA PAULA BRAZOROTTO

Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de  
DNA fetal circulante em gestantes

Ribeirão Preto-SP  
2024

ALINE SILVA PAULA BRAZOROTTO

Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de  
DNA fetal circulante em gestantes

Versão original

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto da Universidade de São Paulo,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutora em  
Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto-SP  
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Brazorotto, Aline Silva Paula

**Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de DNA fetal circulante em gestantes.** Ribeirão Preto, 2024.

124p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética. Orientador: Simões, Aguinaldo Luiz.

1. InDel. 2. cffDNA. 3. qPCR. 4. *primer* inserção-específico 5. *primer* deleção-específico.

## Folha de Aprovação

Nome: Brazorotto, Aline Silva Paula.

Título: Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de DNA fetal circulante em gestantes.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração: Genética.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Ao meu orientador prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, minha gratidão, por ter me aberto novos caminhos na vida acadêmica, possibilitando meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela confiança, paciência e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Às professoras, profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, profa. Dra. Aparecida Maria Fontes e profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, por disponibilizarem seus laboratórios para realização dos experimentos, colaboração fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial, agradeço à Dra. Cláudia Wiesel que me deu todo auxílio técnico e científico nos experimentos, por sua disponibilidade em me ajudar, incentivo e também pela amizade. Eu não teria conseguido sem você, muito obrigada, Cláudia!

Às minhas colegas de laboratório, que se tornaram amigas para toda a vida, Maria Luísa de Barros Rodrigues e Juliet Figueiredo Gonçalves de Souza. Muito obrigada por não terem deixado que eu desistisse, pelo companheirismo e carinho comigo e com a minha família. Malu, minha eterna gratidão, pela sua disponibilidade e ajuda nesta reta final.

À Maria, por estar sempre pronta a ouvir e ajudar, pela amizade contruída nesses anos, pelo carinho e amor que sempre transmite a todos, tornando tudo mais leve.

Às minhas amigas, Marcela e Sabrina, pelo incentivo, apoio e amizade de sempre! Vocês fazem muita falta aqui no laboratório.

As gestantes da UBS "Dr. Rômulo Ribeiro da Costa" CSE Barão de Mauá – Jardim Aeroporto que se dispuseram a participar dessa pesquisa durante a fase mais importante de suas vidas.

Ao Xavier e a Cléo, funcionários da UBS "Dr. Rômulo Ribeiro da Costa", que me deram todo o suporte na coleta das amostras e foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do HC, em especial do laboratório de Hemostasia, que muito contribuíram para meu crescimento profissional e também pela amizade.

Aos professores e funcionários da Creche Carochinha, que cuidaram com tanto amor e dedicação da minha filha, possibilitando meu estudo e trabalho.

A meu marido José Roberto, pelo companheirismo, dedicação, incentivo, por estar sempre disposto a me ouvir e, por tantas vezes, não ter me deixado desistir. Amo você.

Às minhas filhas, Maria Eduarda e Maria Júlia, por tornarem meus dias felizes e me ensinarem o que é essencial na vida.

Aos meus colegas de laboratório que estão ou já passaram pelo bloco B, Ana Lúcia, Ana Maria, Cláudia, Igor, Fernanda, Ana, Thaís, Ayling, Vanessa, Maria, Fernando, Rosana, Beth e d.Maria (bloco A), pela amizade e momentos de descontração ao longo desses anos. Sou muito grata a todos!

À minha amiga Bianca, pelo companheirismo nos estágios e disciplinas e pela amizade nesses anos.

Aos professores do Departamento de Genética e prof. Dr. Edson Martinez, que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos funcionários do do Departamento de Genética, em especial à Susie, pela disponibilidade e auxílio.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuição para o crescimento deste trabalho.

Aos meus pais, Maurício e Cidinha, por sempre estarem do meu lado, me apoiando em todas decisões, serem meu porto seguro e minha alegria. Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, que amo muito. Em especial, à minha irmã Angélica, minha amiga e companheira. Aos meus sogros, pela ajuda e incentivo. Ao meu cumpadre Giovanni, pelo incentivo, amizade e ajuda, desde a época da graduação.

A Deus que me deu forças durante essa trajetória.

## Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

## Resumo

Brazorotto, ASP. Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de DNA fetal circulante em gestantes [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2024;124p.

O objetivo deste trabalho foi quantificar o DNA fetal livre de células (cffDNA) circulante no plasma de gestantes, utilizando marcadores InDels por Real-Time PCR (qPCR) e estabelecer a evolução da quantidade relativa de cffDNA de acordo com a idade gestacional. Para isso, as condições laboratoriais de amplificação de *primers* inserção e deleção-específico/flanqueador de oito locus InDels (rs138730495, rs111797680, rs66501513, rs72083748, rs148112183, rs67519581, rs1610941, rs151001596) foram padronizadas na qPCR e destes, dez *primers* apresentaram especificidade para as análises do DNA fetal circulante. Foram coletadas amostras de *swab* bucal e sangue periférico de 164 gestantes, em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto-SP e selecionadas as mães informativas (del/del ou in/in) em cada locus InDel, com *primers* flanqueadores, na PCR Convencional. A quantificação do cffDNA no plasma materno foi realizada com os *primers* InDels alelo-específicos e a quantificação de DNA plasmático total, utilizando *primers* direcionados a sequências do gene endógeno da  $\beta$ -globina. Não houve evidências de diferença na concentração de DNA total circulante entre os trimestres gestacionais (Kruskal-Wallis  $\chi^2_{(2)} = 0.80$ ,  $p = 0,668$ ). A fração fetal foi estimada em 10,0%, 14,3% e 18,9%, nos sucessivos trimestres gestacionais. Nosso painel de InDels foi informativo em 64% das amostras, com quantificação de 105 das 164 gestantes analisadas. As quantificações com marcadores InDels apresentaram concordância e forte correlação ( $\rho=0,77$ ,  $p<0,001$ ) com aquelas obtidas com *primers* para sequências do gene SRY, em gestantes com feto masculino. O perfil de ancestralidade das gestantes foi inferido pela análise de um painel de 12 AIMs (*ancestry informative markers - AIMs*) e a relação da ancestralidade, bem como do IMC materno, com fração fetal foi avaliada por meio de uma regressão linear. A idade gestacional foi associada a um aumento da fração fetal ( $p=0,0018$  [IC 95%, 0,017–0,077]) e não houve evidências de associação entre o IMC ou a ancestralidade materna com a quantidade relativa de DNA fetal circulante.

Palavras-chave: cffDNA; InDel; Real-Time PCR; *primer* inserção-específico; *primer* deleção-específico.



## ABSTRACT

Brazorotto, ASP. Insertion/Deletion markers in the quantification of circulating fetal DNA in pregnant women [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 124p.

The objective of this study was to quantify the cell-free fetal DNA (cffDNA) circulating in the plasma of pregnant women, using InDels markers by Real-Time PCR (qPCR) and to establish the evolution of the relative amount of cffDNA according to gestational age. For this, the laboratory conditions for amplification of insertion and deletion-specific/flanking primers of eight InDels locus (rs138730495, rs111797680, rs66501513, rs72083748, rs148112183, rs67519581, rs1610941, rs15100159) were standardized in qPCR and of these, ten primers showed specificity for analyzes of circulating fetal DNA. Buccal swab and peripheral blood samples were collected from 164 pregnant women, in partnership with the Municipal Health Department of Ribeirão Preto-SP and the informative mothers (del/del or in/in) were selected at each InDel locus, with flanking primers, in Conventional PCR. Quantification of cffDNA in maternal plasma was performed using allele-specific InDels primers and quantification of total plasma DNA using primers directed to sequences of the endogenous  $\beta$ -globin gene. There was no evidence of difference in the concentration of total circulating DNA between gestational trimestres (Kruskal-Wallis  $\chi^2_{(2)} = 0.80$ ,  $p = 0,668$ ). The fetal fraction was estimated at 10.0%, 14.3% and 18.9%, in successive gestational trimesters. Our panel of InDels was informative in 64% of the samples, with quantification of 105 of the 164 pregnant women analyzed. Quantifications with InDels markers showed agreement and strong correlation ( $\rho=0.77$ ,  $p<0.001$ ) with those obtained with primers for SRY gene sequences, in pregnant women with a male fetus. The pregnant women's ancestry profile was inferred by analyzing a panel of 12 AIMs (ancestry informative markers - AIMs) and the relationship between ancestry, as well as maternal BMI, with fetal fraction was evaluated using a linear regression. Gestational age was associated with an increased fetal fraction ( $p=0.0018$  [95% CI, 0.017–0.077]) and there was no evidence of an association between BMI or maternal ancestry with the relative amount of circulating fetal DNA.

Keywords: cffDNA; InDel; real-time PCR; insertion-specific primer; deletion-specific primer.

## Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema da posição relativa dos *primers* (roxo) utilizados na detecção de polimorfismos InDel. (a) Alelo inserção com *primers* Forward e Reverse flanqueadores à região da inserção e *primers* Forward-i e Reverse-i complementares à inserção. (b) Alelo deleção com *primers* Forward e Reverse flanqueadores e *primers* Forward-d e Reverse-d complementares à deleção..... 20
- Figura 2. Fenótipos observados (in/in, in/del ou del/del) dos lócus rs138730495, rs111797680, rs66501513 e rs72083748 após PCR convencional com *primers* flanqueadores à inserção. Padrão (*ladder*) com *amplicons* de 100 e 200 pb aplicado na primeira coluna. br = controle negativo. .... 42
- Figura3. Fenótipos observados (in/in, in/del ou del/del) dos lócus rs151001596, rs1610941, rs148112183 e rs67519581 após PCR convencional com *primers* flanqueadores à inserção. Padrão (*ladder*) com *amplicons* de 100 e 200 pb aplicado na primeira coluna. br = controle negativo. .... 42
- Figura 4. Curva-padrão com diluições seriadas (em vermelho) para quantificação do DNA total circulante no plasma das gestantes (amostras em verde), com *primers* para o gene  $\beta$ -globina..... 45
- Figura 5. Boxplot com distribuição dos resultados da quantificação do DNA total ( $\beta$ -globina) nos trimestres gestacionais..... 46
- Figura 6. Estimativa da ancestralidade global com o painel de 12 AIMs. (A) Dispersão da amostra brasileira de gestantes (BRA) entre três clusters de populações representantes das ancestrais: AFR (vermelho), EUR (verde) e AME (azul). Cada ponto corresponde a um indivíduo. (B) Proporções de ancestralidade individual (STRUCTURE, K=3), em que cada barra corresponde a um indivíduo. Vermelho, verde e azul representam as estimativas de contribuição africana (AFR), europeia (EUR) e ameríndia (AME), respectivamente. .... 47
- Figura 7. Curva-padrão com diluições seriadas (pontos em vermelho) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados

(curva de melting) com primers (A) inserção-específico/flanqueador do locus rs138730495 (B) deleção- específico/flanqueador do locus rs138730495 (C) inserção-específico/flanqueador do locus rs111797680 (D) deleção-específico/flanqueador do locus rs111797680 (E) inserção-específico/flanqueador do locus rs66501513. .... 48

Figura 8.(A) Curva-padrão com diluições seriadas (pontos vermelhos) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados (curva de melting) com primers (A) deleção-específico/flanqueador do locus rs66501513 (B) deleção-específico/flanqueador do locus rs72083748 (C) inserção-específico/flanqueador do locus rs148112183 (D) deleção-específico/flanqueador do locus rs148112183 e (E) inserção-específico/flanqueador do locus rs67519581. .... 52

Figura 9. Curva-padrão com diluições seriadas (pontos em vermelho) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados (curva de melting) com primers (A) deleção-específico/flanqueador do locus rs67519581 (B) ) inserção-específico/flanqueador do locus rs151001596 (C) deleção-específico/flanqueador do locus rs151001596 (D) inserção-específico/flanqueador do locus rs1610941(E) deleção-específico/flanqueador do locus rs1610941. .... 57

Figura 10. Boxplot com distribuição dos resultados da fração de DNA fetal (%) nos trimestres gestacionais. .... 59

Figura 11. Modelo de regressão linear com associação positiva entre a fração fetal circulante e a idade gestacional. .... 60

Figura 12. Curva de eficiência com os primers para sequencia do gene SRY. .... 61

Figura 13. Gráfico de Bland-Altman:concordância entre as quantificações pelos marcadores Indels e SRY. A linha preta horizontal representa a média das diferenças, ou viés ( $=0,055$ ) entre os dois métodos, e as linhas horizontais vermelhas pontilhadas mostram os limites superior e inferior de concordância de 95% ( $=\text{viés} \pm 1,96 \times s$ ) (B) Gráfico de dispersão e Correlação de Spearman entre marcadores indels e SRY ( $\rho =$  coeficiente de correlação de Spearman). .... 62

## Lista de Tabelas

- Tabela 1. Características dos lócus InDels: identificação no dbSNP, cromossomos em que estão localizados, tamanho (em pb) da inserção. As letras F e R referem-se a *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. A letra *i* refere-se a primers dirigidos à sequência inserção e a letra *d* a *primers* deleção-específicos..... 32
- Tabela 2. Pares, concentrações e quantidade de *primers* e tamanho dos *amplicons* gerados nas reações de PCR Convencional para cada lócus InDel. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. .... 33
- Tabela 3. Pares de *primers* de cada lócus, quantidade de *primers* e suas respectivas temperaturas (°C) nas reações de qPCR. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. A letra *i* refere-se aos *primers* dirigidos à sequência inserção e a letra *d* a *primers* deleção-específicos..... 35
- Tabela 4. Sequências e concentrações de *primers* e sondas nas reações de qPCR, para amplificação da  $\beta$ -globina e SRY. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. .... 36
- Tabela 5. Características da população em estudo. .... 41
- Tabela 6. Frequências genotípicas, frequência do alelo inserção ( $p_i$ ), número de indivíduos esperados, heterozigose observada ( $H_o$ ), heterozigose esperada ( $H_e$ ), probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$ -EHW) de cada lócus InDel..... 43
- Tabela 7. Eficiência dos primers InDels padronizados na qPCR. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. A letra *i* refere-se aos *primers* dirigidos à sequência inserção e a letra *d* a *primers* deleção-específicos. Os parâmetros *slope* e  $R^2$  correspondem, respectivamente, à declividade da reta e ao coeficiente de correlação linear..... 44
- Tabela 8. Concentração de DNA total (materno e fetal) circulantes ao longo da gestação, quantificados com *primer* para sequências do gene  $\beta$ -globina. IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão, n= número de amostras. .... 45

Tabela 9. Resultado da quantificação com <i>primers</i> inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs138730495. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	49
Tabela 10. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs138730495. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	49
Tabela 11. Resultado da quantificação com <i>primers</i> inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs111797680. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	50
Tabela 12. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs111797680. ....	50
Tabela 13. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs66501513. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	51
Tabela 14. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs72083748. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	51
Tabela 15. Resultado da quantificação com <i>primers</i> inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs148112183. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	53
Tabela 16. Resultado da quantificação com <i>primers</i> inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs67519581. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	54
Tabela 17. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs67519581. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	54

Tabela 18. Resultado da quantificação com primer inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs151001596. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	55
Tabela 19. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs151001596. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	55
Tabela 20. Resultado da quantificação com <i>primers</i> inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs1610941. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	56
Tabela 21. Resultado da quantificação com <i>primers</i> deleção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs1610941. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	56
Tabela 22. Fração fetal (%) estimada ao longo dos trimestres gestacionais, com marcadores InDels. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão. ....	58
Tabela 23. Modelos de regressão linear testados para associação de variáveis com a fração fetal circulante.....	61

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	17
1.1 DNA fetal livre de células (cffDNA) .....	17
1.2 Marcadores moleculares na análise do cffDNA.....	18
1.3 A concentração de cffDNA durante a gravidez.....	21
1.4 Concentração de cffDNA e alterações gestacionais .....	22
1.5 Análise de Ancestralidade .....	24
2. Justificativa .....	26
3. Hipótese.....	27
4. Objetivos.....	28
4.1 Objetivo Geral.....	28
4.2 Objetivos Específicos .....	28
5. Material e Métodos .....	29
5.1 Delineamento Experimental.....	29
5.2 Casuística .....	30
5.3 Aspectos Éticos.....	30
5.4 Análise Laboratorial.....	31
5.4.1 Coleta e Conservação das amostras.....	31
5.4.2 Extração de DNA.....	31
5.4.3 Marcadores Genéticos Inserção/Deleção analisados.....	31
5.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase .....	33
5.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante.....	33
5.4.6 Coloração e secagem de gel .....	34
5.4.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	34
5.4.8 Parâmetros populacionais .....	38
5.4.9 Análise de Ancestralidade .....	39
5.4.10 Análise estatística .....	39
6. Resultados .....	41
6.1 Características da população em estudo.....	41
6.2 Determinação fenotípica .....	41
6.3 Parâmetros populacionais.....	42

6.4 Determinação das condições laboratoriais de amplificação com <i>primers</i> alelo específicos por qPCR.....	43
6.5 Quantificação do DNA total circulante .....	44
6.6 Análise de Ancestralidade .....	46
6.7 Quantificação de DNA fetal com marcadores InDels.....	47
Locus rs138730495 .....	47
Locus rs111797680 .....	49
Locus rs66501513 .....	50
Locus rs72083748 .....	51
Locus rs148112183 .....	53
Locus rs67519581 .....	53
Locus rs151001596 .....	54
Locus rs1610941 .....	55
6.8 Quantificação da fração de DNA fetal com marcadores InDels .....	58
6.9 Características maternas e fração fetal .....	59
6.10 Quantificação com SRY e comparação com marcadores Indels .....	61
7. DISCUSSÃO .....	63
7.1 Padronização dos primers InDels e parâmetros de qualidade da qPCR.....	63
7.2 Determinação fenotípica e parâmetros populacionais .....	65
7.3 Quantificação do DNA total ( $\beta$ -globina) .....	65
7.4 Ancestralidade.....	66
7.5 Quantificação da fração fetal no plasma materno .....	67
7.6 Associação da fração fetal com características maternas .....	68
7.7 Comparação dos marcadores InDels com SRY .....	69
7.8 Informatividade dos marcadores InDels .....	70
8.CONCLUSÃO .....	72
9.REFERÊNCIAS.....	74
10. APÊNDICES .....	82
11. ANEXOS .....	100



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 DNA fetal livre de células (cffDNA)

A presença de células fetais na corrente sanguínea materna é conhecida desde 1969, quando foram detectadas células com cariótipo masculino no sangue periférico de gestantes, a partir de 14 semanas de gestação (WALKNOWSKA; CONTE; GRUMBACH, 1969). Anos mais tarde, foi descrita a presença de DNA fetal livre de células (cell-free fetal DNA, cffDNA) no plasma de gestantes de feto masculino materno, após amplificação de sequências do cromossomo Y por PCR em Tempo Real (qPCR) (LO et al., 1997, p. 199).

A maior parte do DNA no plasma das gestantes é de origem materna, proveniente da apoptose de células hematopoiéticas (LUI et al., 2002) e do tecido adiposo, em gestantes obesas (HAGHIAC et al., 2012). A origem principal do cffDNA são as células trofoblásticas da placenta (ALBERRY et al., 2007; TAGLAUER; WILKINS-HAUG; BIANCHI, 2014) cujo DNA é liberado na circulação materna em decorrência de processos apoptóticos durante o crescimento e remodelagem placentários (HUPPERTZ; KINGDOM, 2004).

Células sanguíneas fetais também podem atravessar as membranas amnióticas (ALBERRY; SOOTHILL, 2008; WATAGANARA et al., 2004) e serem lisadas pelo sistema imune da mãe (PERTL et al., 2000), o que também contribui para o aumento do cffDNA na circulação materna.

As células fetais podem persistir por muito tempo na circulação materna (BIANCHI, 2004). Em contrapartida, a concentração de cffDNA decresce rapidamente (LO et al., 1999) e é praticamente indetectável dois dias após o parto (SC Yu et al., 2013).

Embora o genoma fetal esteja completamente representado na circulação materna (LO et al., 2010), ele se apresenta na forma de fragmentos de DNA menores que 313 pares de bases (KIMURA et al., 2011).

Dessa forma, é um grande desafio distinguir e quantificar o material genético fetal em meio à quantidade massiva de DNA materno livre. Para esta finalidade, têm sido empregados diferentes procedimentos e marcadores moleculares, tais como a genotipagem de STRs por PCR convencional, genotipagem de SNPs por diferentes

técnicas de sequenciamento, identificação de sequências marcadas epigeneticamente e quantificação por qPCR de marcadores ligados ao cromossomo Y, cujas descrições são resumidas a seguir.

## 1.2 Marcadores moleculares na análise do cffDNA

Os **STRs** (*Short Tandem Repeats*) ou **SSR** (*Simple Sequence Repeats*) são polimorfismos formados por segmentos curtos repetitivos *in tandem* em arranjos relativamente uniformes de até  $10^2$  pares de base (pb) de comprimento (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). São marcadores amplamente utilizados na identificação humana e em estudos populacionais (KAYSER et al., 2000). Os *primers* utilizados na PCR, para amplificação dos STRs, são complementares às sequências flanqueadoras das repetições. No plasma materno, os sítios de pareamento dos *primers* estão presentes tanto no genoma fetal quanto no materno. Em decorrência da maior concentração de material genético materno em relação ao fetal ocorre competição pelos *primers* e consequente amplificação preferencial do genoma materno (WAGNER et al., 2009).

Os **SNPs** (*Single Nucleotide Polymorphism*) são variações na sequência de DNA que afetam uma única base, isto é, são formados por um ponto de mutação único, sendo a maioria bialélicos. Os SNPs, apesar de possibilitarem produtos de amplificação muito curtos, o que é vantajoso quando se trabalha com DNA fragmentado como o cffDNA, estão sujeitos ao mesmo problema gerado na análise de STRs, com competição entre os genomas materno e fetal pelos sítios de ligação dos *primers* e consequente amplificação preferencial do genoma materno.

Mais recentemente, **marcadores epigenéticos**, sequências de DNA diferentemente metiladas entre o genoma materno e fetal, foram empregados para identificar e quantificar o cffDNA (DELLA RAGIONE et al., 2010; NYGREN et al., 2010; TSUI; CHIU; LO, 2010). O gene RASSF1A, por exemplo, tem sido amplamente utilizado para mensuração do cffDNA. A região promotora desse gene encontra-se hipermetilada na placenta e hipometilada no sangue materno, desta forma, após a digestão com enzimas de restrição, apenas as sequências placentárias (fetais) hipermetiladas são detectáveis e quantificáveis por qPCR (CHAN et al., 2006). Diferentemente dos marcadores genéticos convencionais, os marcadores

epigenéticos são feto período-específicos, sendo independentes de herança parental e seu uso não é restrito pelo sexo fetal (ZHANG et al., 2011). Entretanto, o estado de metilação do DNA tende a ser afetado por muitos fatores, incluindo a composição ancestral e fatores ambientais, além de variações interindividuais observadas no padrão de metilação de sequências entre o DNA materno e fetal (ZHANG et al., 2011).

O uso de *primers* complementares a sequências presentes apenas no genoma fetal, como **sequências do cromossomo Y** (HORINEK et al., 2008; LO et al., 1998; YU et al., 2013) evita a competição entre as mesmas regiões do genoma materno e fetal pelas *primers*. Contudo, a utilização dessas sequências Y específicas restringe a análise às gestações de feto masculino.

Seguindo a idéia de amplificar sequências exclusivamente fetais SANTOS (2014) propôs o uso de **Marcadores Inserção/Deleção (InDels)** e demonstrou a possibilidade de genotipagem fetal na circulação materna com três loci desses marcadores.

Os polimorfismos InDels são gerados pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, variando de 1 base a 1 kb em comprimento (MILLS et al., 2011).

Para genotipagem dos polimorfismos InDels utilizam-se os pares de *primers* complementares às regiões flanqueadoras (*Forward/Reverse*). Estes permitem a identificação dos três fenótipos possíveis para um locus InDel bi-alélico. Já o iniciador específico para inserção em conjunto com o flanqueador correspondente (*Forward-i/Reverse* ou *Forward/Reverse-i*) possibilitam a detecção apenas da inserção, quando presente. O iniciador complementar a inserção pode ser *Forward-i* (complementar à fita 3'>5') ou *Reverse-i* (complementar à fita 5'>3'), desde que o seu par referente à região flanqueadora esteja em sentido oposto ao seu (Figura 1).

Para a amplificação do cfDNA com esses marcadores foram utilizados *primers* direcionados a sequências inserção exclusivas fetais em conjunto com *primers* flanqueadores, nas situações em que a mãe é homocigota *del/del* e o feto heterocigoto *in/del*.

Além dos *primers* complementares à inserção, foi descrito por (RODRIGUES, 2018), também em dissertação realizada em nosso laboratório, os *primers* direcionados ao alelo deleção. Analogamente ao *primer* específico para o alelo inserção, o *primer*

direcionado à deleção pareia-se na região imediatamente anterior ao ponto em que a sequência inserção ocorre, e esse pareamento termina após esse ponto de inserção (Figura 1b). Dessa forma, ao ser utilizado em conjunto com um segundo *primer* flanqueador, possibilita a amplificação apenas na ausência da inserção. O uso de *primers* complementares a sequências deleção específicas fetais, em conjunto com um segundo *primer* flanqueador possibilita a detecção de alelos fetais nas situações em que a mãe é homozigota *in/in* e o feto potencialmente *in/del*, aumentando a informatividade dos marcadores InDel bi-alélicos.

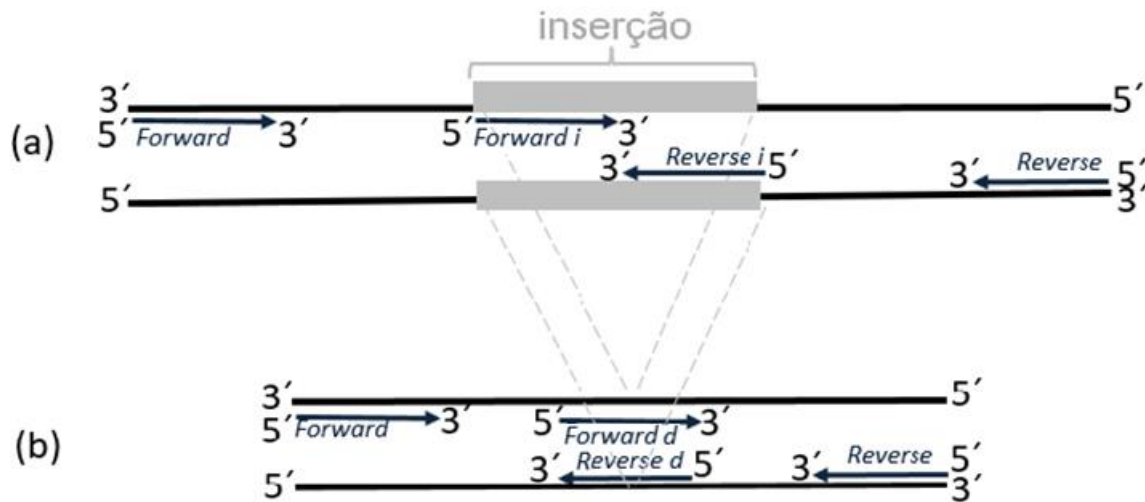


Figura 1. Esquema da posição relativa dos *primers* (roxo) utilizados na detecção de polimorfismos InDel. (a) Alelo inserção com *primers* Forward e Reverse flanqueadores à região da inserção e *primers* Forward-i e Reverse-i complementares à inserção. (b) Alelo deleção com *primers* Forward e Reverse flanqueadores e *primers* Forward-d e Reverse-d complementares à deleção.

Partindo da mesma metodologia descrita por SANTOS (2014), em nosso trabalho de Mestrado (BRAZOROTTO; SIMÕES, 2017), demonstramos a viabilidade da aplicação dos marcadores InDels para quantificação do cffDNA. Quatro loci InDels foram utilizados para padronização da técnica e quantificação de cffDNA no plasma das gestantes informativas, utilizando os *primers* inserção-específico/flanqueador, por qPCR.

Os marcadores InDels apresentam-se adequados para análise de cffDNA uma vez que permitem a amplificação de sequências fetais sem que a alta concentração de DNA materno interfira na análise. Além de evitar a competição entre o genoma materno e fetal, o uso de pequenos InDels possibilita a amplificação das sequências

alvo em curtos *amplicons*, o que melhora a detecção e quantificação do cffDNA (BARRETT et al., 2012; SIKORA et al., 2010).

Os InDels estão amplamente distribuídos pelo genoma (MILLS et al., 2011; WEBER et al., 2002), sendo os InDels bialélicos os polimorfismos mais abundantes depois dos SNPs (HUANG et al., 2014). Eles originam-se de um único evento mutacional, que ocorre com uma frequência baixa, sendo posteriormente estáveis (NACHMAN; CROWELL, 2000). E a genotipagem de InDels pode ser feita por meio de uma PCR simples, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ou mesmo utilizando metodologias já descritas para SNPs.

### 1.3 A concentração de cffDNA durante a gravidez

A concentração relativa de cffDNA aumenta com o progresso da gestação (LO et al., 1998; WANG et al., 2013). A concentração relativa de cffDNA pode ser afetada ainda por determinadas características maternas, como a etnia (GEROVASSILI et al., 2006; POON et al., 2013), o tabagismo e o índice de massa corpórea, com o qual estabelece uma relação inversa (ASHOOR et al., 2013; THURIK et al., 2016). As concentrações de DNA fetal estão alteradas ainda em casos de aneuploidias fetais. Em gestações trissômicas, o DNA derivado do cromossomo extra contribui com um aumento na proporção de cffDNA em relação ao que seria esperado em uma gravidez com feto euploide (NICOLAIDES et al., 2013). Além disso, em complicações gestacionais, como a pré-eclâmpsia, os níveis de cffDNA parecem estar significativamente aumentados (SIFAKIS; KOUKOU; SPANDIDOS, 2015).

Ainda que a maior parte da variação nos níveis de cffDNA observada entre os indivíduos seja biológica, muitos fatores técnicos podem causar discrepâncias entre os valores descritos, como por exemplo as diferenças nos métodos de extração de DNA (DEVONSHIRE et al., 2014), o intervalo de tempo entre a coleta de sangue e o processamento da amostra, a temperatura de transporte das amostras (WANG et al., 2015), os tubos de coleta utilizados (FERNANDO et al., 2010; WANG et al., 2015) e os marcadores utilizados para quantificação do cffDNA (Horinek et al., 2008). As comparações diretas de diferentes metodologias nas mesmas amostras e a subsequente padronização da abordagem serão necessárias para permitir conclusões mais eficazes no futuro (VAN BOECKEL et al., 2017).

#### 1.4 Concentração de cffDNA e alterações gestacionais

Na busca por marcadores que possam auxiliar o diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia, o cffDNA no plasma materno tem sido investigado (SIFAKIS; KOUKOU; SPANDIDOS, 2015), uma vez que sua origem está relacionada a processos de apoptose das células trofoblásticas da placenta (HUPPERTZ; KINGDOM, 2004). A pré-eclâmpsia é um distúrbio gestacional, multissistêmico, caracterizado por hipertensão (pressão sistólica/diastólica  $\geq 140/90$  mmHg) e proteinúria (excedendo 300mg, em urina de 24h), após a 20<sup>a</sup> semana de gravidez (*American College of Obstetricians and Gynecologists* (2013)).

Dada a disfunção e o dano placentário presente na pré-eclâmpsia é biologicamente plausível que alterações nos níveis de cffDNA estejam correlacionados com esta condição (SILVER et al., 2017). Concentrações significativamente mais elevadas de DNA fetal livre no plasma de mulheres com pré-eclâmpsia têm sido relatados em alguns estudos, em comparação com aquelas evidenciadas em gestações normais (ABDELHALIM et al., 2016; ALBERRY et al., 2009; KIM; KIM, 2015; MUÑOZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; PAPANTONIOU et al., 2013; YU et al., 2013).

Esses achados podem ser atribuídos ao aumento da apoptose e necrose das células trofoblásticas, resultante da isquemia placentária, evidenciado na pré-eclâmpsia (ISHIHARA et al., 2002) e consequente liberação de fragmentos necróticos e apoptóticos na circulação materna, na forma de nós sinciciais. Há evidências ainda de que, na pré-eclâmpsia, além de maior liberação de cffDNA na circulação materna, há também uma redução na depuração do material fetal no plasma materno (LAU et al., 2002), o que também poderia contribuir com a elevação da fração de cffDNA.

Entretanto, a utilização do DNA fetal livre como um marcador para a pré-eclâmpsia ainda é controversa (CONTRO; BERNABINI; FARINA, 2017), uma vez que muitos outros estudos não encontraram correlações entre as concentrações de cffDNA no plasma materno e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (CROWLEY et al., 2007; POON et al., 2013; ROLNIK et al., 2015).

Resultados contraditórios também são evidenciados em relação à concentração do DNA total livre no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia. Em alguns casos, o

aumento do cfDNA na pré-eclâmpsia é acompanhado por elevação na quantidade de DNA total livre no plasma materno (PAPANTONIOU et al., 2013; SALVIANTI et al., 2015), enquanto que, em outras situações, apenas os níveis de DNA total livre estão alterados (KIM et al., 2016). Foi relatado ainda que a baixa fração fetal está associada a um risco aumentado de complicações na gravidez, como a pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal, possivelmente devido a um aumento menos pronunciado no cfDNA comparado ao DNA livre materno, com uma consequente redução na fração fetal (ROLNIK et al., 2018b).

Um possível fator de viés entre os trabalhos refere-se à forma de divisão das pacientes analisadas quanto à gravidade da pré-eclâmpsia (CONTRO; BERNABINI; FARINA, 2017). Além disso, muitos estudos não consideraram adequadamente possíveis fatores de interferência na concentração de cfDNA, como índice de massa corpórea (IMC), tabagismo e ancestralidade materna (MARTIN et al., 2014).

Com relação aos marcadores empregados, parte dos estudos adotou como marcadores sequências do cromossomo Y, como SRY e DYS, em gestações com fetos masculinos (COTTER et al., 2004; CROWLEY et al., 2007; SIFAKIS et al., 2009; YU et al., 2013). Outros utilizaram-se de marcadores epigenéticos, como RASSF1A, na tentativa de predição da pré-eclâmpsia (KIM et al., 2015, 2016; MUÑOZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; PAPANTONIOU et al., 2013).

Além da pré-eclâmpsia, outras alterações gestacionais têm sido associadas aos níveis de cfDNA e DNA livre total na corrente sanguínea materna. Há evidências de que o nascimento prematuro, definido como trabalho de parto antes de 37 semanas de gestação, também é associado com o aumento dos níveis de cfDNA após a 20<sup>a</sup> semana gestacional, ou com o aparecimento de sintomas de parto prematuro espontâneo (VAN BOECKEL et al., 2017). Recentemente, o interesse cresceu no potencial do cfDNA para induzir a inflamação e a cascata de reações do parto (HERRERA et al., 2017; PHILLIPPE, 2014), dado que o parto é reconhecido como um evento inflamatório.

O trabalho de parto espontâneo é mediado pela ativação de vias de sinalização relacionadas à inflamação, levando ao aumento da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ao influxo de neutrófilos e macrófagos no útero grávido e ao aumento da produção de proteínas de ativação uterina. O cfDNA

atuaria como um elo, um sinal fetal ou placentário que desencadeia esses eventos pró-inflamatórios na ausência de invasão microbiana e infecção intra-uterina. Há evidências de que os níveis de cffDNA aumentam durante a maturação placentária e atingem um pico no final da gestação, ativando o sistema imune inato, com consequente produção de proteínas de ativação uterina, resultando em amadurecimento cervical, ruptura das membranas fetais e contrações femorais miométricas (PHILLIPPE, 2014).

Uma conclusão precisa sobre a relevância estatística e clínica do cffDNA e do DNA total livre como um marcadores para alterações gestacionais ainda não pode ser feita, principalmente devido à significativa heterogeneidade entre os estudos publicados (CONTRO; BERNABINI; FARINA, 2017; MARTIN et al., 2014). E também não há consenso sobre a faixa normal de cffDNA em qualquer ponto da gestação (VAN BOECKEL et al., 2017).

#### 1.5 Análise de Ancestralidade

A ancestralidade tem sido bem documentada como um fator de risco significativo para uma série de complicações gestacionais (CHANG et al., 2014). A incidência da pré-eclâmpsia é significativamente mais elevada em mulheres afro-americanas que em caucasianas (CAUGHEY et al., 2005; TANAKA et al., 2007) e a afro-descendência é considerada um fator de risco para a pré-eclâmpsia (ANSELEM et al., 2011).

Diferenças nas dosagens de cffDNA e DNA total livre materno também foram relatadas entre mulheres com diferentes perfis de ancestralidade. Níveis mais elevados de DNA total livre, mas menores de cffDNA, foram observados na população Africana e Afro-Caribenha em comparação com a Norte Européia (GEROVASSILI et al., 2006). Entretanto em um trabalho posterior, mulheres de origem afro-caribenha e asiática exibiram níveis de DNA total e cffDNA maiores que mulheres de origem caucasiana (POON et al., 2013).

Neste contexto, a população brasileira se destaca devido a sua formação tri-híbrida, resultado de mais de cinco séculos de mistura populacional, inicialmente entre ameríndios, europeus e africanos e, mais recentemente, entre indivíduos de outras nacionalidades (BORTOLINI; SALZANO, 2005). Em populações altamente



miscigenadas, como a brasileira, torna-se necessária a análise de um conjunto de marcadores informativos de ancestralidade (*ancestry informative markers - AIMS*) para minimizar os efeitos da estratificação populacional em estudos genéticos (GALANTER et al., 2012). Os AIMS são polimorfismos genéticos que exibem diferenciais de frequência alélica superiores a 30% entre duas populações parentais e, portanto, permitem a inferência da ancestralidade em populações miscigenadas (BONILLA et al., 2004; SILVA et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os níveis de cffDNA ao longo da gestação são influenciados por fatores biológicos, como a idade gestacional e características maternas. Entretanto, muitos fatores técnicos causam divergências entre as quantificações de cffDNA relatadas em diferentes estudos (DEVONSHIRE et al., 2014). Devido a heterogeneidade dos trabalhos, ainda existem lacunas com relação a valores de referências do cffDNA ao longo da gestação.

Além disso, a falta de conclusões e as discrepâncias observadas entre os trabalhos publicados a respeito do valor potencial do cffDNA em complicações gestacionais, apontam para a necessidade de mais estudos no esclarecimento da relevância clínica desse marcador.

As abordagens quantitativas tradicionais do cffDNA analisam principalmente sequências exclusivas fetais, como do cromossomo Y e, dessa forma, ficam limitadas às gestações de feto masculino. A quantificação do cffDNA com marcadores InDels, tal como a proposta em nosso trabalho de Mestrado, pode ser aplicada independentemente do sexo fetal e não sofre interferências do DNA materno, presente em quantidade predominante.

As revisões bibliográficas que abordam a relação da concentração de cffDNA com complicações gestacionais (CONTRO; BERNABINI; FARINA, 2017; MARTIN et al., 2014; SIFAKIS; KOUKOU; SPANDIDOS, 2015; VAN BOECKEL et al., 2017), não há menção do uso de marcadores InDels na quantificação do DNA fetal no plasma materno, com uso de *primers* alelo-específicos.

Já foi demonstrado que a ancestralidade pode interferir nos níveis de cffDNA observados em diferentes indivíduos (POON et al., 2013; SILVER et al., 2017). Contudo, a influência desse componente nos níveis de cffDNA não foi investigada em populações altamente miscigenadas, como a brasileira.

A mensuração do DNA fetal com marcadores InDels, aliada ao correto controle das variáveis de interferência na quantidade de cffDNA, como a ancestralidade, pode fornecer resultados adicionais sobre a dinâmica desse marcador ao longo da gestação.

### 3. HIPÓTESE

O uso de *primers* específicos aos marcadores InDels, tal como é aqui proposto, permitirá dosagens precisas do cffDNA na circulação materna ao longo da gestação.

O ajuste dos dados segundo a características maternas e as proporções de ancestralidade mostrarão o eventual efeito destes fatores sobre a fração de DNA fetal no plasma materno.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Quantificar o DNA fetal circulante no plasma de gestantes, utilizando marcadores InDels por qPCR, para estabelecer a evolução da quantidade relativa de cffDNA ao longo da gestação e verificar a influência de características maternas nessas concentrações.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as condições de amplificação, por qPCR, de *primers* inserção-específico/flanqueador e deleção-específicos/flanqueador de um conjunto de oito marcadores InDels selecionados para quantificação de cffDNA;
2. Quantificar o cffDNA no plasma das gestantes informativas em cada marcador com os *primers* inserção-específicos/flanqueador ou deleção-específicos/flanqueador, por qPCR.
3. Quantificar o DNA total (materno e fetal), utilizando *primers* do gene endógeno  $\beta$ -globina por qPCR, e dessa forma, estimar a fração fetal no plasma sanguíneo materno;
4. Quantificar o cffDNA no plasma das gestantes com feto masculino, com os *primers* SRY.
5. Comparar os resultados obtidos com marcadores InDels com aqueles fornecidos pelo marcador SRY;
6. Inferir o perfil de ancestralidade das gestantes analisadas e correlacionar os resultados coma fração de cffDNA.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento Experimental

Inicialmente foi selecionado de um conjunto de oito lócus InDels previamente descritos em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa e as condições de amplificação dos *primers* específicos à inserção e *primers* específicos à deleção, em conjunto com os *primers* flanqueadores correspondentes, foram padronizadas por qPCR.

Foram coletadas, em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e com a Secretaria Municipal de Saúde do Município de Ribeirão Preto, na UBS "Dr. Rômulo Ribeiro da Costa" CSE Barão de Mauá – Jardim Aeroporto, amostras de *swab* bucal e de sangue periférico de 164 gestantes, durante o atendimento de rotina pré-natal.

O DNA extraído de *swab* bucal das mães foi avaliado com os *primers* InDels flanqueadores, por PCR Convencional, para seleção das mães informativas (*del/del* ou *in/in*) em cada lócus InDel.

A quantificação do cfDNA no DNA extraído do plasma das mães, por qPCR, foi realizada com o emprego dos *primers* inserção-específico/flanqueador ou deleção-específico/flanqueador, conforme metodologia descrita em nosso trabalho de Mestrado (BRAZOROTTO, 2017) e os resultados comparados com as quantificações obtidas com o marcador SRY.

A quantificação do DNA total do plasma (materno e fetal) foi realizada, por qPCR, utilizando *primers* direcionados a sequências do gene endógeno  $\beta$ -globina. A fração fetal foi calculada pela razão entre o DNA fetal livre e DNA total livre.

O perfil de ancestralidade das gestantes foi estimado mediante a análise de um painel de *AIMs*, por PCR Convencional, previamente descrito (CAGNIN, 2015). Foi investigada a associação da fração fetal de DNA circulante no plasma materno com IMC materno e o perfil de ancestralidade das gestantes.

## 5.2 Casuística

O presente trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Declaração – ANEXOS) e com a Secretaria Municipal de Saúde do Município de Ribeirão Preto (Aprovação - ANEXOS). Durante o atendimento ginecológico de rotina nos postos de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), as gestantes são convidadas a participar do presente estudo mediante concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO III).

Foram coletadas 190 amostras transversais de gestantes, e destas, 26 amostras foram excluídas devido a ocorrência de gravidez gemelar (1), aborto (9), ausência de registros no prontuário (12) e comorbidades (4). Desta forma, foram incluídas no estudo n=164 gestantes de qualquer idade gestacional, de único feto, sem histórico de hipertensão anterior à gestação e/ou outras complicações médicas ou obstétricas. Foram coletadas uma amostra de *swab* bucal e uma amostra de sangue periférico (cerca de 5mL) de cada gestante.

Os dados clínicos das mães foram obtidos a partir da consulta aos prontuários médicos eletrônicos. Foram registrados a idade, altura e peso maternos, idade gestacional, sexo do bebê, número de gestações anteriores e eventuais alterações gestacionais.

## 5.3 Aspectos Éticos

As amostras foram coletadas mediante a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – ANEXO III. O projeto, bem como o TCLE foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Parecer nº: 2.911.390; CAAE: 95894918.7.0000.5440- ANEXO I) e pela Comissão de Avaliação de Projeto de Pesquisa (CAPP) da Secretaria de Saúde do Município de Ribeirão Preto (ANEXO II).

## 5.4 Análise Laboratorial

### 5.4.1 Coleta e Conservação das amostras

As amostras de *swab* bucal das mães foram coletadas em tubos *Vacutainer* com solução salina para extração de DNA.

O sangue periférico das mães foi coletado via punção venosa em tubos *Vacutainer* com anticoagulante EDTA. O plasma, separado por centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm, em no máximo duas horas após a coleta, foi armazenado em microtubos e estocado à temperatura de -20°C. Após adicionar à fração celular igual volume de glicerol 40% em tampão de citrato de potássio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>K<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O 0,1 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,035 M; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,035 M), as amostras são estocadas a -20°C, no Departamento de Genética da FMRP-USP.

### 5.4.2 Extração de DNA

O DNA das amostras de *swab* bucal foi extraído segundo o Protocolo adaptado de Higuchi (1989), descrito no Apêndice C. Essas amostras foram utilizadas para fenotipagem das mães, nas reações de PCR Convencional.

O DNA de plasma sanguíneo foi extraído utilizando-se o Kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Apêndice D). Essas amostras foram utilizadas para as reações de PCR em Tempo Real.

### 5.4.3 Marcadores Genéticos Inserção/Deleção analisados

Oito locos de marcadores InDels bi-alelicos descritos em projetos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (NG, 2015; RODRIGUES, 2018; SANTOS, 2014b) foram utilizados para o presente trabalho (Tabela1). Estes marcadores foram selecionados a partir do Banco de Dados *dbSNP* e *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), cujos critérios para seleção foram a heterozigose entre 30% a 50%, tamanho mínimo da sequência de inserção de 20pb e locos que possibilitassem o desenho de *primers* flanqueadores e alelo-específicos (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos lócus InDels: identificação no dbSNP, cromossomos em que estão localizados, tamanho (em pb) da inserção. As letras F e R referem-se a *primers Forward e Reverse*, respectivamente. A letra *i* refere-se a primers dirigidos à sequência inserção e a letra *d* a primers deleção-específicos.

Locus db SNP	Localização Cromossômica	Tamanho da inserção (pb)	Sequência (5'-3')
rs138730495	Chr1 (q23.3)	26	<i>Ins</i> - <u>AGTCATGACCCAATCACACACTAAGG</u> <i>F</i> - GAACAGGCATGGATGCTCA <i>R</i> - AGCTTGGGCGACAAAGTGA <i>Fi</i> - TGACCCAATCACACACTAAGG <i>Fd</i> - TGACAGGTGAGGTTAAGCTGG
rs111797680	Chr2 (p25.2)	24	<i>Ins</i> - <u>GTCTTAGAGAACAGAAGAGGCAGG</u> <i>F</i> - AGGATTGACTCTTCTGATCAG <i>R</i> - ATCACTGTTGTTAGGACGCA <i>Fi</i> - TTAGAGAACAGAAGAGGCAGG <i>Fd</i> - AGAGCAATGCCTAGTCCGC
rs66501513	Chr6 (q27)	30	<i>Ins</i> - <u>CACTCCAGTCTGGCAACAGAGACTCTGTCT</u> <i>F</i> - GAATGGCTTGAACCTGGGA <i>R</i> - AGGACTGCGTAGTTTTGAGC <i>Fi</i> - ACTCCAGTCTGGCAACAGAGA <i>Fd</i> - GCGATGGTGCCACTGTAAAA
rs72083748	Chr17 (q24.3)	26	<i>Ins</i> - <u>GCTTGTATTGCACATCACACATACCC</u> <i>F</i> - CCATTTCTCAGTGTGCTTG <i>R</i> - CCATCGAAGCATCAGGAGA <i>Fi</i> - ATTGCACATCACACATACCC <i>Fd</i> - TTCAGGGTGCATGCTGTT
rs148112183	Chr19 (p13.3)	26	<i>Ins</i> - <u>CCCAGCGTCTCCCTGTCCGCACTGAT</u> <i>F</i> - CCTCTCTGCTGTGTGGACTT <i>R</i> - CTGGACCTCACTCTCCTCAC <i>Fi</i> - TCTCCCTGTCCGCACTGAT <i>Fd</i> - TGAATCAGTTCCCCGCT
rs67519581	Chr22 (q12.2)	32	<i>Ins</i> - <u>GCGTGGCCTGATAACAGGGTAAGAGTCCAGAG</u> <i>F</i> - GTGAGTGAGGGGACAGTCGT <i>R</i> - TGCAGGCCTGACATAGACC <i>Fi</i> - TGGCCTGATAACAGGGTAAGA <i>Fd</i> - AGTCGTGTTGAGTGCCCTC
rs151001596	Chr 5(p13.2)	40	<i>Ins</i> - <u>ATGGTTCATTGTGCTGTGCCTGTGACCCTTGCAAGGTGGT</u> <i>F</i> - TGGCGTTTCATCTCTTTGG <i>R</i> - CACAGGCTTGCAAATCTCTG <i>Fi</i> - GTTCATTGTGCTGCTGTGCCTGT <i>Rd</i> - CTGCACCATGTTAGTTAATACTA
rs1610941	Chr 5(q12.3)	26	<i>Ins</i> - <u>GAATCTTCTAATCACAACGAAGAAGA</u> <i>F</i> - AACATGGGAACTGCTCATTA <i>R</i> - TATTGTGCTCATTTTCTGGG <i>Ri</i> - TTCGTTGTGATTAGAAGATTC <i>Rd</i> - CTGGGTCGACACTTTTATG



#### 5.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase

As reações de PCR convencional foram realizadas segundo o protocolo descrito no Apêndice E. As quantidades de *primers* utilizadas no mix de reagentes podem variar conforme o marcador analisado e estão especificadas na Tabela 2, descritas por (SANTOS, 2014), (RODRIGUES, 2018) e (NG, 2015).

Tabela 2. Pares, concentrações e quantidade de *primers* e tamanho dos *amplicons* gerados nas reações de PCR Convencional para cada locus InDel. As letras F e R referem-se aos *primers Forward e Reverse*, respectivamente.

Locus	Pares de <i>primers</i>	Primer 2,5 µM (µL)	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	
			alelo inserção	alelo deleção
rs138730495	F/R	0,75/1,0	194	168
rs111797680	F/R	0,75/1,0	234	210
rs66501513	F/R	0,75/0,75	245	215
rs72083748	F/R	1,0/1,0	127	101
rs148112183	F/R	0,75/0,75	171	145
rs67519581	F/R	0,75/1,0	103	71
rs151001596	F/R	2,0/2,0	115	75
rs1610941	F/R	2,0/2,0	138	112

Em cada análise, adicionou-se ao ensaio um controle negativo contendo água em vez de DNA. As reações de amplificação do DNA ocorreram no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

As condições de amplificação foram as seguintes: aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos seguidos por 31 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e finalmente extensão a 72°C por 10 minutos.

#### 5.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante

Os resultados dos produtos amplificados na PCR Convencional foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE)10% conforme descrição no Apêndice F. A eletroforese teve duração aproximada de duas horas, com fonte de voltagem constante, ajustada a 200 V e 400 mA.

#### 5.4.6 Coloração e secagem de gel

Após o término da eletroforese foi feita a coloração do gel com nitrato de prata e secagem do gel seguindo o protocolo descrito no Apêndice G. O gel foi identificado e armazenado para registro dos resultados e consultas posteriores.

#### 5.4.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

##### 5.4.7.1 Padronização das reações de qPCR com marcadores *InDels*

As reações de PCR em Tempo Real para quantificação com lócus indels utilizaram como fluoróforo o corante Sygreen ®PCR Biosystems. As reações de PCR em Tempo Real ocorreram conforme descrito no Apêndice H. Foram determinadas as condições de amplificação com os pares de *primers* inserção-específico/flanqueador (*Forward-i/Reverse* ou *Forward/Reverse-i*) e deleção-específico/flanqueador (*Forward-d/Reverse* ou *Forward/Reverse-d*) de cada marcador Indel.

Para padronização das condições de amplificação foram testadas inicialmente diferentes concentrações dos *primers* para cada um dos marcadores analisados, a fim de se definir a menor concentração capaz de produzir o melhor sinal de detecção, ou seja, um Ct menor e maior  $\Delta R_n$ , pela análise das curvas de amplificação.

Para isso, foi utilizada uma quantidade fixa de DNA genômico (2  $\mu$ L na concentração de 10 ng/ $\mu$ L) e variaram-se as concentrações iniciais dos *primers* (1,0  $\mu$ M; 1,5  $\mu$ M; 2,0  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 3,0  $\mu$ M). Pela análise dos picos na curva de dissociação, verificou-se também se houve formação de dímeros de *primers* ou amplificação inespecífica.

Na etapa seguinte, com a determinação da concentração ideal a ser empregada de cada *primer*, foi verificada a eficiência dos *primers* por meio de uma curva-padrão. Para isso, a quantidade de cada *primer* foi fixada e a quantidade de DNA foi alterada, em uma diluição seriada.

Para a curva de eficiência dos *primers* referentes aos lócus rs138730495, rs111797680, rs66501513, rs72083748, rs148112183 e rs67519581 foram feitas cinco diluições seriadas (1:10) de DNA controle *in/del* de 100 ng a 0,01 ng. Para a

curva de eficiência dos primers do locus rs1610941 e rs151001596, o fator de diluição utilizado foi 1:4 e as quantidades de DNA utilizadas foram: 20 ng, 5 ng, 1,25 ng, 0,31 ng, 0,07 ng e 0,01 ng. Para curva com *primers* inserção-específico/flanqueador do locus rs72083748, o fator de diluição foi de 1:5, e as quantidades de DNA utilizadas foram de 100ng a 0,8ng. Todas as diluições de DNA utilizadas na construção da curva foram realizadas em triplicatas.

Em cada análise, adicionou-se ao ensaio um controle negativo contendo água em vez de DNA, além de um DNA padrão *del/del* ou *in/in*, na concentração de 20ng, como controles negativos na amplificação com *primers* inserção-específico/flanqueador e deleção-específico/flanqueador, respectivamente.

As condições de amplificação por qPCR dos primers InDels foram determinadas, sendo os reagentes e soluções descritos no Apêndice H e as quantidades de *primers* e temperatura de pareamento determinadas encontram-se detalhadas na Tabela 3, uma vez que variam conforme o locus analisado.

Tabela 3. Pares de *primers* de cada locus, quantidade de *primers* e suas respectivas temperaturas (°C) nas reações de qPCR. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente. A letra i refere-se aos *primers* dirigidos à sequência inserção e a letra d a *primers* deleção-específicos.

Locus	Pares de <i>primers</i>	Quantidade de primer 2,5 µM (µL)	Temperatura de pareamento (°C)
rs138730495	Fi/R	1,2/1,2	63
	Fd/R	1,0/1,0	65
rs111797680	Fi/R	1,0/1,0	65
	Fd/R	1,4/1,4	63
rs66501513	Fi/R	0,6/0,6	63
	Fd/R	1,0/1,0	65
rs72083748	Fi/R	1,4/1,4	65
	Fd/R	1,2/1,2	65
rs148112183	Fi/R	0,4/0,4	65
	Fd/R	0,4/0,4	65
rs67519581	Fi/R	0,8/0,6	65
	Fd/R	0,4/0,4	65
rs151001596	Fi/R	0,4/0,32	65
	F/Rd	0,6/0,6	65
rs1610941	F/Ri	0,8/0,8	63
	F/Rd	0,4/0,4	63

As reações ocorreram no termociclador Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System. As condições de amplificação dos lócus indels seguiram as recomendações do fabricante e consistiram em: aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e extensão por 25 segundos. A temperatura de pareamento/extensão adequada de cada lócus encontra-se na Tabela 3.

A curva de dissociação foi produzida ao final de todas as reações de amplificação aumentando a temperatura até 95°C por 15 segundos. Os ensaios com PCR em Tempo Real tiveram seus resultados visualizados no programa StepOne Software versão 2.3 (Applied Biosystems).

#### 5.4.7.2 Reações de qPCR com $\beta$ -globina e SRY

As reações de amplificação com primers para sequências do gene  $\beta$ -globina e SRY foram realizadas pelo sistema TaqMan, segundo as condições descritas por (LO et al., 1998). As sequências e concentrações de *primers* e sondas utilizadas encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências e concentrações de *primers* e sondas nas reações de qPCR, para amplificação da  $\beta$ -globina e SRY. As letras F e R referem-se aos *primers Forward* e *Reverse*, respectivamente.

Marcador (GenBank sequence database)	<i>Primers e sondas</i>	Sequência dos primers e sondas	Concentração dos <i>primers</i>
$\beta$ -globina (U01317)	F	5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3'	300 nM
	R	5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3'	300 nM
	Sonda	5'-(FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG(TAMRA)-3'	100 nM
SRY (L08063)	F	5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3'	300 nM
	R	5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3'	300 nM
	Sonda	5'-(FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3'	100 nM

As reações ocorreram no termociclador Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System. As condições de amplificação consistiram em: aquecimento inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de uma etapa de desnaturação por 10

minutos, a 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os ensaios tiveram seus resultados visualizados no programa StepOne Software versão 2.3 (Applied Biosystems).

#### 5.4.7.3 Quantificação do DNA Fetal Circulante e DNA Total no Plasma das Gestantes

As reações de qPCR para quantificação do cfDNA foram realizadas com DNA extraído de plasma das gestantes informativas, ou seja, mães homozigotas del/del ou homozigotas in/in, com filhos heterozigotos in/del, em cada um dos locos InDels analisados.

A construção da curva-padrão foi realizada a partir de diluições seriadas de DNA padrão de indivíduo heterozigoto in/del em cada marcador, previamente quantificado por fluorimetria. As quantidades de DNA utilizadas na curva-padrão foram de 20ng; 5ng; 1,25ng; 0,312ng; 0,078ng e 0,019ng. Foi utilizado 7µl de DNA extraído de plasma em cada reação para quantificação do DNA fetal com marcadores indels e com o marcador SRY e 5µl de DNA para quantificação do DNA total circulante, com os primers da β-globina.

As quantidades de *primers* e condições de amplificação seguiram aquelas determinadas para cada marcador, descritas na tabela 3). Os valores de slope, y intercept e Ct obtidos são utilizados na equação da reta de regressão linear para o cálculo da quantidade inicial de DNA alvo presente em cada amostra de plasma. A reta de regressão linear é dada pela seguinte equação:

$$y = ax + b$$

Em que,

y: Ct da amostra

a: inclinação da curva-padrão (slope)

x: log da concentração de DNA da amostra

b: y intercept

A concentração de DNA, expressa em ng/mL foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$C = Q \times \frac{V_{DNA}}{V_{PCR}} \times \frac{1000}{V_{ext}}$$

Em que,

C= Concentração DNA no plasma (ng/mL);

Q= Quantidade (ng) determinada na reação de qPCR;

V<sub>DNA</sub>= Volume de eluição do DNA obtido após extração (50µL - Apêndice D).

V<sub>PCR</sub>= Volume de DNA utilizado na reação de qPCR (7µL ou 5µL);

V<sub>ext</sub>= Volume de plasma utilizado na extração de DNA (400µL - Apêndice D).

A definição de equivalente genômico (GE) foi usada para converter ng/mL em cópias/mL:

$$1 \text{ GE/mL} = 2 \text{ cópias/ mL} = 6,6 \text{ pg/ mL (Genoma diploide)}$$

#### 5.4.8 Parâmetros populacionais

As frequências alélicas e genotípicas para cada um dos loci InDels e a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GENEPOP® (ROUSSET, 2008). A heterozigose esperada (He) refere-se à proporção de indivíduos heterozigotos esperados no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Heterozigose observada (Ho) é a proporção de heterozigotos observada na população. Ambas podem ser estimadas segundo as equações:

$$H_o = \frac{n_{id}}{n} \quad \text{e} \quad H_e = 2pq$$

Em que:

$n_{id}$  = número observado de heterozigotos;

$n$  = número total de indivíduos analisados;

$p$  = frequência do alelo inserção;

$q$  = frequência do alelo deleção

#### **5.4.9 Análise de Ancestralidade**

As amostras de DNA das mães foram avaliadas com um painel de *AIMs* previamente descrito em nosso grupo de pesquisa (CAGNIN, 2015). Tal painel é composto por 12 *AIMs* anteriormente descritos por (SHRIVER et al., 1997) e (LUIZON et al., 2009) capazes de diferenciar europeus, africanos e/ou ameríndios. Desses marcadores, cinco foram genotipados por PCR-RFLP como *SNPs* (*CKM* rs4884:C>T, *DRD-2* rs1079598:C>T, *FY-Null* rs2814778:A>G, *LPL* rs285:C>T, *RB2300* rs2252544:C>T), sete foram genotipados por PCR convencional, incluindo inserções *Alu* (*Sb19.3* rs3138524, *APO* rs3138522, *PV92* rs3138523) e *InDels* (*AT3-I/D* rs3138521, *MID-52* rs16344, *MID-93* rs16383, *MID-575* rs140864). A ancestralidade individual foi estimada utilizando-se o *software Structure* v2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), adotando-se o modelo tri-híbrido de miscigenação, com  $K=3$ .

#### **5.4.10 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no R v. 4.3.1 (<http://www.r-project.org/>). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de  $X^2$  Quadrado de Pearson e a distribuição dos dados expressos em mediana foram comparadas entre os grupos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o o post-hoc de Dunn, para os resultados com significância estatística.

A correlação entre a quantificação obtida do cfDNA com marcadores *InDels* e *SRY* foi avaliada pela correlação de Spearman e concordância entre os métodos pela análise de Bland-Altman.

As análises de regressão linear simples e múltipla foram realizadas com a fração fetal como variável quantitativa dependente e a idade gestacional, o IMC e a

ancestralidade materna (europeia, africana e ameríndia) como variáveis quantitativas independentes. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Breusch-Pagan. Para atender o pressuposto de distribuição normal dos resíduos do modelo, necessário para análise de regressão linear, foi realizada a transformação Box-Cox dos dados da fração fetal.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características da população em estudo

Na Tabela 5 são apresentadas as características das 164 gestantes, com idade gestacional entre 4 semanas e 37 semanas +1 dia, incluídas no estudo. As amostras foram divididas em trimestres gestacionais, sendo incluídas no 1º Trimestre as mães com idade gestacional até 13 semanas e 6 dias, no 2º Trimestre, gestantes de 14 semanas até 27 semanas e 6 dias e no 3º Trimestre, gestantes entre 28 semanas e 41 semanas e 6 dias.

Tabela 5. Características da população em estudo.

Características maternas	Trimestre gestacional			Total n=164
	1º Trimestre (n=73)	2º Trimestre (n=47)	3º Trimestre (n=44)	
Idade Gestacional (semanas)	7,5 (6,4 - 9,3)	23,7 (21,6 - 25,3)	31,7 (30,8 - 33,3)	20,7(7,8-28,8)
Idade materna (anos)	24,8 (21,3-28,3)	22,9 (20,9-27,0)	23,8 (20,3-30,7)	24,1(21,0-27,9)
Peso (Kg)	63,8 (55,5 -74,8)	63,2(53,8 -77,6)	65,7(57,6-75,3)	65,0(55,9-75,7)
Altura (metros)	1,6 (1,55 -1,65)	1,59 (1,56 -1,63)	1,6 (1,57 - 1,63)	1,6(1,56-1,64)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,8 (20,9 -28,4)	24,9 (22,2-29,4)	26,1 (23,8-28,2)	25,7(21,8-28,5)
Nuliparidade, primigesta (%)	26 (35,6)	25 (53,1)	12 (27,2)	63(38,4)

Os dados são expressos em mediana (IQR) ou em n (%)

A distribuição dos dados expressos em mediana foram comparadas entre os grupos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as proporções, no caso de variáveis categóricas (nuliparidade) foram comparadas pelo teste de X<sup>2</sup> Quadrado de Pearson. Não houve diferença estatística na idade materna (gl=2, p=0,4207), no peso (gl=2, p= 0,7953), na altura (gl=2, p=0,9883), no IMC materno (gl=2, p=0,6631) e na nuliparidade (X<sup>2</sup>= 5.857, gl= 2, p= 0,0534) entre os trimestres gestacionais, considerando um  $\alpha=0,05$ .

### 6.2 Determinação fenotípica

Nas Figuras 2 e 3 estão representados oito lócus InDels analisados e o padrão de bandas obtidos após amplificação por PCR Convencional utilizando *primers* flanqueadores à inserção (*Forward* e *Reverse*). Dessa forma, foi possível a classificação em três possíveis fenótipos: a) homozigose para o alelo inserção

(*in/in*); homozigose para o alelo deleção (*del/del*) e heterozigose (*in/del*). A lista completa com os resultados de cada uma das gestantes encontra-se no Apêndice A.

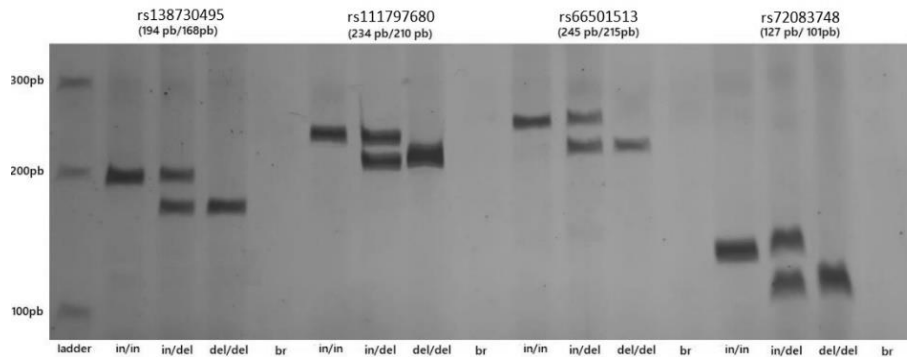


Figura 2. Fenótipos observados (*in/in*, *in/del* ou *del/del*) dos lócus rs138730495, rs111797680, rs66501513 e rs72083748 após PCR convencional com *primers* flanqueadores à inserção. Padrão (*ladder*) com *amplicons* de 100 e 200 pb aplicado na primeira coluna. br = controle negativo.

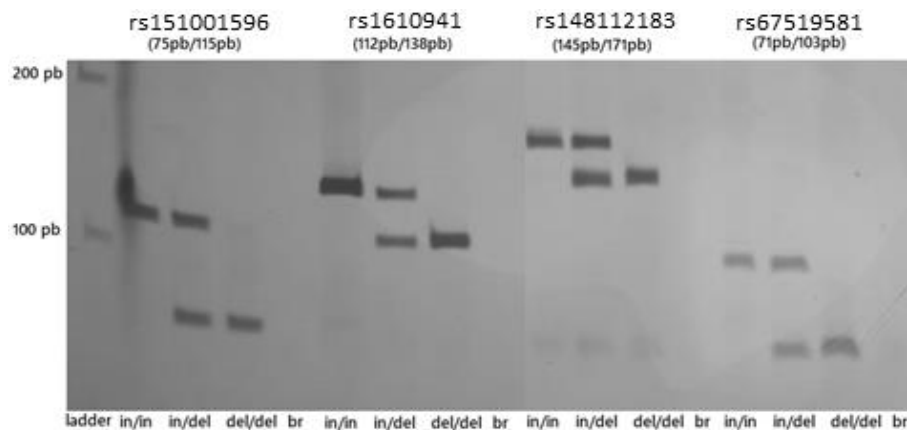


Figura 3. Fenótipos observados (*in/in*, *in/del* ou *del/del*) dos lócus rs151001596, rs1610941, rs148112183 e rs67519581 após PCR convencional com *primers* flanqueadores à inserção. Padrão (*ladder*) com *amplicons* de 100 e 200 pb aplicado na primeira coluna. br = controle negativo.

### 6.3 Parâmetros populacionais

As frequências genótípicas observadas e esperadas, frequência do alelo inserção ( $p_i$ ), heterozigose observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e o valor de  $p$  do teste exato para

o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-EHW) encontrados para cada marcador InDel estão descritos na Tabela 6. O marcador rs111797680 foi o único a apresentar desvio das proporções esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesse grupo, o teste p-EHW foi refeito, considerando a hipótese alternativa ( $H_1$ ) para o déficit de heterozigotos, que foi significativa ( $p= 0,0296$ ).

Tabela 6. Frequências genotípicas, frequência do alelo inserção ( $p_i$ ), número de indivíduos esperados, heterozigose observada ( $H_o$ ), heterozigose esperada ( $H_e$ ), probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-EHW) de cada locus InDel.

Locus	nº de indivíduos observados			$p_i$	nº de indivíduos esperados			p- EHW	$H_o$	$H_e$
	ii	id	dd		ii	id	dd			
rs138730495	95	57	10	0,762	94,05	58,88	9,05	0,667	0,3519	0,3627
rs111797680	47	68	48	0,496	40,12	81,74	41,12	0,046*	0,4121	0,5000
rs66501513	59	66	35	0,575	52,77	78,44	28,77	0,052	0,4125	0,4888
rs148112183	46	88	22	0,576	51,80	76,39	27,80	0,076	0,5641	0,4884
rs67519581	50	82	32	0,554	50,37	81,25	32,37	1,000	0,5000	0,4942
rs151001596	61	81	20	0,626	63,47	76,04	22,47	0,499	0,5000	0,4682
rs1610941	21	80	61	0,376	22,85	76,29	62,85	0,619	0,4938	0,4692
rs72083748	62	78	24	0,615	62,08	77,83	24,08	1,000	0,4756	0,4736

\* $p < 0,05$

6.4 Determinação das condições laboratoriais de amplificação com *primers* alelo específicos por qPCR

A Tabela 7 apresenta os resultados dos *slopes*, coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) e eficiências obtidas após amplificação das diluições seriadas com os *primers* inserção-específico/flanqueador e deleção-específico/flanqueador dos oito locus InDels padronizados. A curva de dissociação dos fragmentos amplificados (Apêndice B) apresenta um pico de *melting* correspondente à amplificação de um fragmento em cada um dos locus analisados. Os controles negativos não apresentaram amplificação, com exceção dos *primers* deleção-específicos/flanqueador dos locus rs66501513 e rs67519581 e *primers* inserção-específicos/flanqueador do locus rs148112183, que geraram Cts próximos a 38, utilizando como controle DNA (ii ou dd) de 20ng.

Tabela 7. Eficiência dos primers InDels padronizados na qPCR. As letras F e R referem-se aos *primers Forward e Reverse*, respectivamente. A letra *i* refere-se aos *primers* dirigidos à sequência inserção e a letra *d* a *primers* deleção-específicos. Os parâmetros *slope* e  $R^2$  correspondem, respectivamente, à declividade da reta e ao coeficiente de correlação linear.

Lócus	Primers	<i>slope</i>	$R^2$	Eficiência
rs138730495	Fi/R	-3,155	0,993	107,4%
	Fd/R	-3,478	0,978	93,8%
rs111797680	Fi/R	-3,275	0,985	102,0%
	Fd/R	-3,213	0,986	104,7%
rs66501513	Fi/R	-3,230	0,971	103,9%
	Fd/R	-3,492	0,981	93,3%
rs72083748	Fi/R	-3,126	0,861	108,8%
	Fd/R	-3,209	0,958	104,9%
rs148112183	Fi/R	-3,121	0,984	109,1%
	Fd/R	-3,168	0,969	106,8%
rs67519581	Fi/R	-3,108	0,995	109,7%
	Fd/R	-3,152	0,989	107,6%
rs151001596	Fi/R	-3,460	0,986	94,5%
	F/Rd	-3,550	0,982	91,2%
rs1610941	F/Ri	-3,450	0,940	94,3%
	F/Rd	-3,173	0,975	106,6%

## 6.5 Quantificação do DNA total circulante

A quantificação de DNA total (materno e fetal) circulante no plasma das gestantes realizada com primers para sequências do gene  $\beta$ -globina apresentaram eficiência de 85,3% e 97,7%, e correlação linear de 0,994 e 0,996 (Figura 4). As concentrações obtidas em cada trimestre gestacional estão descritas na Tabela 8 e a distribuição dos dados estão representadas no boxplot (Figura 5). Não houve diferença estatística na concentração de DNA total circulante entre os trimestres gestacionais (Kruskal-Wallis qui-quadrado  $gl= 0.8061$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.6683$ ).

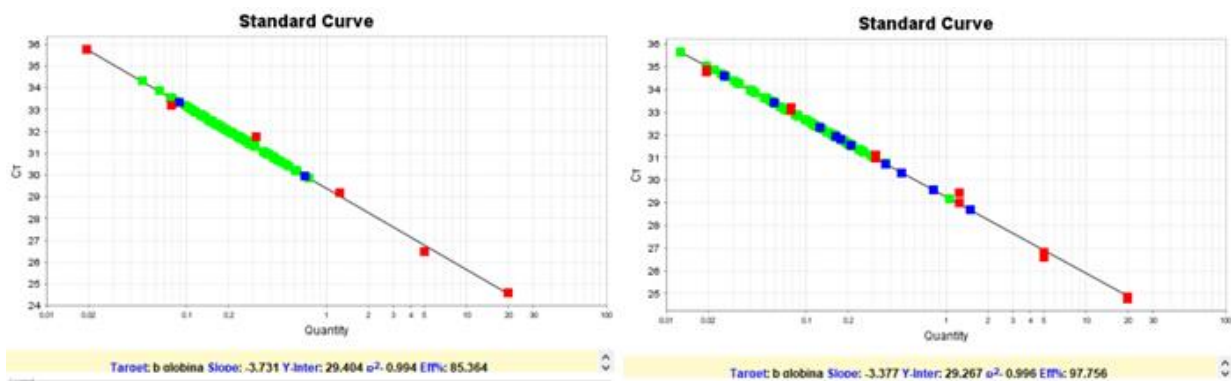


Figura 4. Curva-padrão com diluições seriadas (em vermelho) para quantificação do DNA total circulante no plasma das gestantes (amostras em verde), com *primers* para o gene  $\beta$ -globina.

Tabela 8. Concentração de DNA total (materno e fetal) circulantes ao longo da gestação, quantificados com *primer* para sequências do gene  $\beta$ -globina. IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão, n= número de amostras.

Trimestre Gestacional	n	DNA total (ng/mL de plasma)			média (DP)
		min	máx	mediana (IQR)	
1º Trimestre	73	0,550	12,865	3,988(2,70 – 5,94)	4,52 (2,50)
2º Trimestre	47	0,678	15,000	4,144(2,09 – 4,98)	4,74 (3,57)
3º Trimestre	44	0,317	11,296	3,849(1,71 -6,025)	4,26(2,88)
Total	164	0,317	15,000	4,024(2,22-5,88)	4,52(2,92)

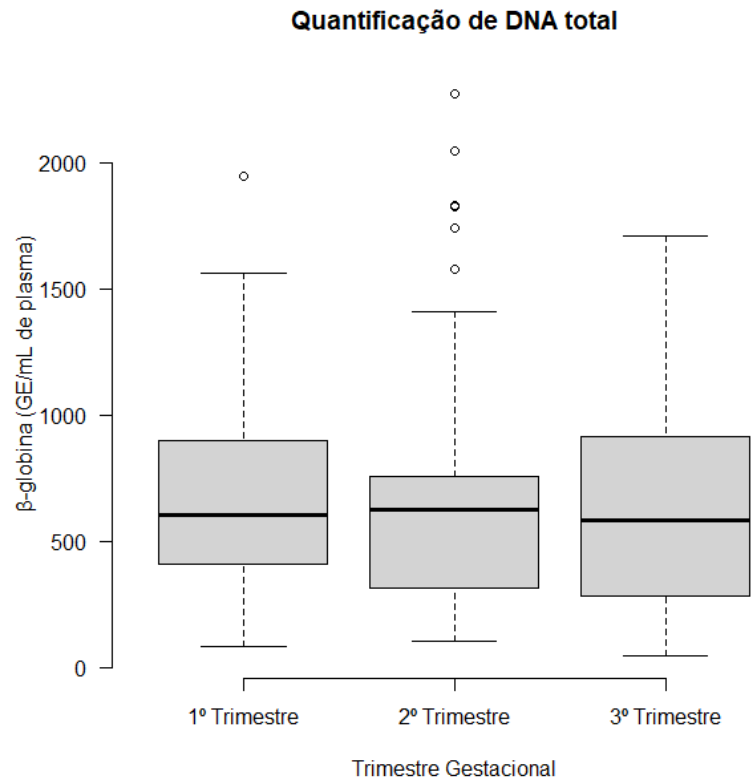


Figura 5. Boxplot com distribuição dos resultados da quantificação do DNA total ( $\beta$ -globina) nos trimestres gestacionais.

#### 6.6 Análise de Ancestralidade

A ancestralidade individual de cada uma das 164 gestantes foi estimada e as proporções de ancestralidade de cada uma, representado por uma barra, podem ser observadas na Figura 6(B). As populações representantes das ancestrais africana (AFR), europeia (EUR) e ameríndea (AME) compuseram três clusters (Figura 6A), com a maioria dos indivíduos alocada em cada extremidade do triângulo. A população de estudo, amostra brasileira de gestantes da cidade de Ribeirão Preto (BRA), encontra-se dispersa entre os *clusters*, como esperado para uma população altamente miscigenada. A composição ancestral estimada da nossa amostra (BRA) foi de 40,7%, 35,5% e 23,9% de composição europeia, africana e ameríndia, respectivamente.

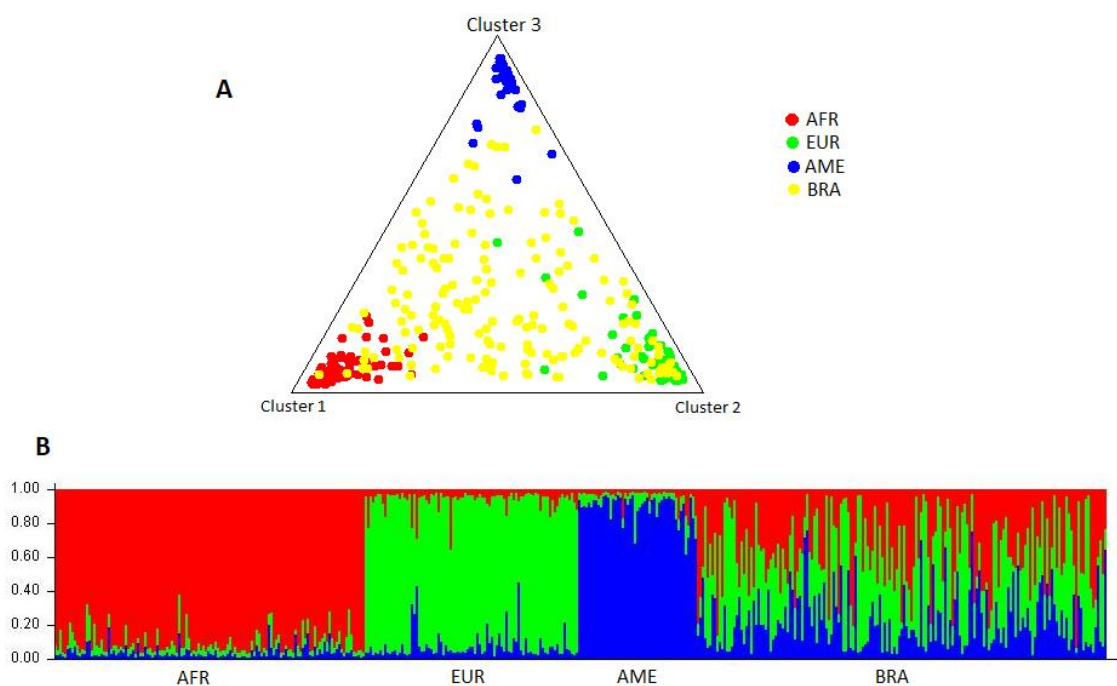


Figura 6. Estimativa da ancestralidade global com o painel de 12 AIMs. (A) Dispersão da amostra brasileira de gestantes (BRA) entre três clusters de populações representantes das ancestrais: AFR (vermelho), EUR (verde) e AME (azul). Cada ponto corresponde a um indivíduo. (B) Proporções de ancestralidade individual (STRUCTURE, K=3), em que cada barra corresponde a um indivíduo. Vermelho, verde e azul representam as estimativas de contribuição africana (AFR), europeia (EUR) e ameríndia (AME), respectivamente.

## 6.7 Quantificação de DNA fetal com marcadores InDels

### Lócus rs138730495

A reação de qPCR com o *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do lócus rs138730495, foi realizada com amostras de 10 gestantes potencialmente informativas (dd) e destas, 6 amostras foram quantificadas (Tabela 9). A Figura 7 (A) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 82,3% e o  $R^2=0,946$ .

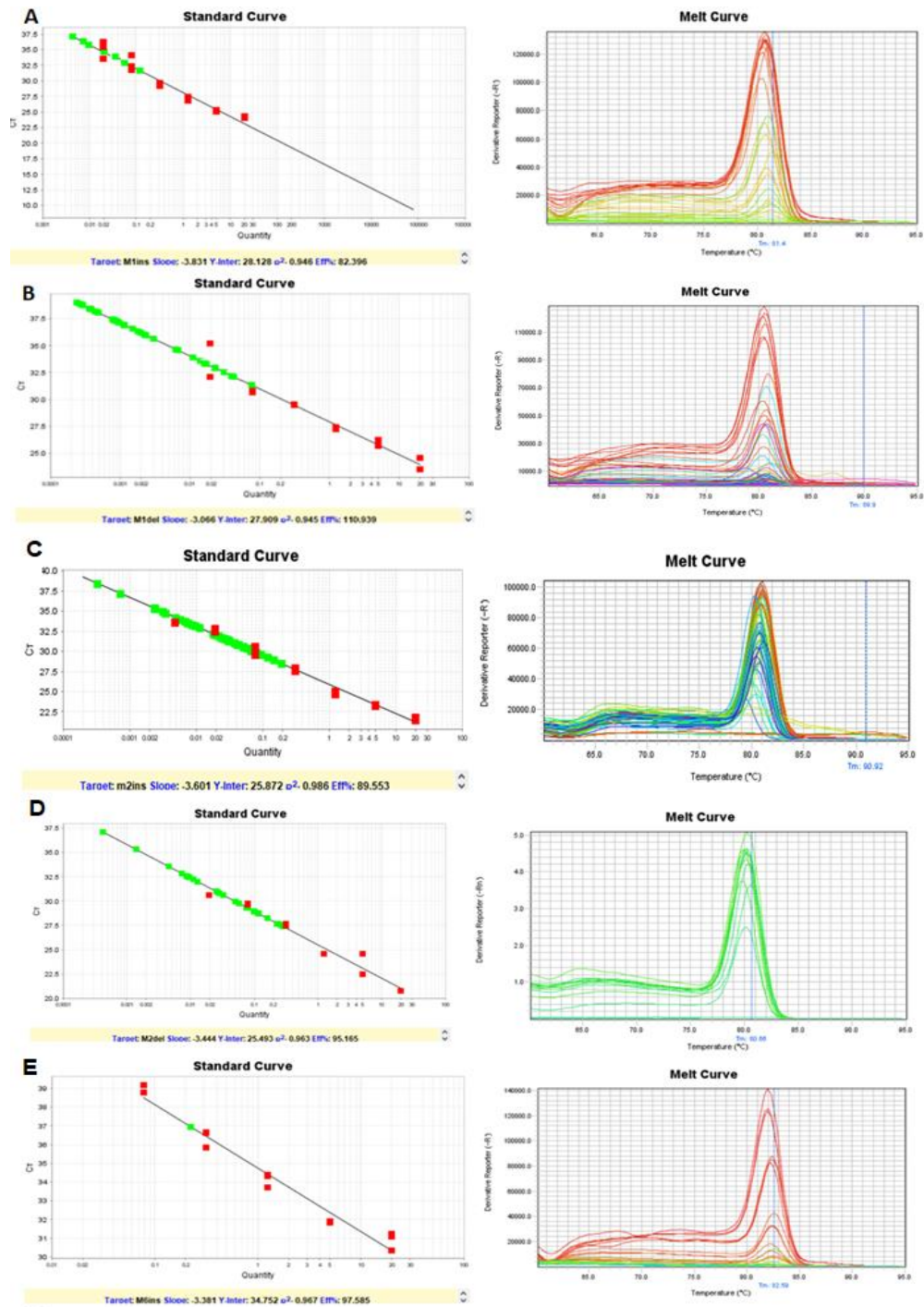


Figura 7. Curva-padrão com diluições seriadas (pontos em vermelho) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados (curva de melting) com primers (A) inserção-específico/flanqueador do locus rs138730495 (B) deleção- específico/flanqueador do locus rs138730495 (C) inserção-específico/flanqueador do locus rs111797680 (D) deleção-específico/flanqueador do locus rs111797680 (E) inserção-específico/flanqueador do locus rs66501513.



Tabela 9. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs138730495. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> rs138730495				
	cffDNA (ng/mL de plasma)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	2	0,130	2,14	1,135(0,633-1,637)	1,13(1,42)
2º Trimestre	1	0,173	0,173	0,173	0,173
3º Trimestre	3	0,078	0,997	0,361(0,219-0,679)	0,48(0,47)

Amostras de 95 gestantes potencialmente informativas (ii) foram testadas na qPCR com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs138730495, e 10 amostras apresentaram amplificação. A Figura 7(B) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 111,9% e o  $R^2=0,945$ . A Tabela 10 apresenta os resultados das amostras quantificadas.

Tabela 10. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs138730495. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R rs138730495				
	cffDNA (ng/mL de plasma)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	5	0,032	0,405	0,053(0,041-0,350)	0,176 (0,18)
2º Trimestre	4	0,035	1,361	0,377(0,156-0,758)	0,538(0,59)
3º Trimestre	1	0,253	0,253	0,253	0,253

### Locus rs111797680

A reação de qPCR com o *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs111797680, foi realizada com amostras de 48 gestantes potencialmente informativas (dd) e destas, 28 amostras foram quantificadas (Tabela 11). A Figura 7(C) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 89,5% e o  $R^2=0,986$ .

Tabela 11. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs111797680. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Quantificação com <i>primers</i> Fi/R (rs111797680)					
Trimestre Gestacional	cffDNA (ng/mL de plasma)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	12	0,138	2,166	0,543 (0,489-0,989)	0,77 (0,57)
2º Trimestre	09	0,200	1,249	0,520 (0,471-0,561)	0,56 (0,29)
3º Trimestre	07	0,135	2,673	0,561 (0,200-0,904)	0,79 (0,89)

A reação de qPCR com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs111797680, foi realizada com amostras de 47 gestantes potencialmente informativas (ii) e destas, 20 amostras foram quantificadas (Tabela 12). A Figura 7 (D) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 95,1% e o  $R^2=0,963$ .

Tabela 12. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs111797680.

Quantificação com <i>primers</i> Fd/R rs111797680					
Trimestre Gestacional	cffDNA (ng/mL de plasma)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	09	0,080	2,093	0,195(0,163-0,507)	0,614(0,75)
2º Trimestre	04	0,154	4,276	0,409(0,212-1,510)	1,312(1,98)
3º Trimestre	07	0,231	1,394	0,506(0,433-0,629)	0,629(0,39)

### Locus rs66501513

A reação com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs66501513, foi realizada com amostras de 35 gestantes potencialmente informativas (dd), porém houve amplificação de apenas uma amostra, que posteriormente foi excluída do trabalho devido a ocorrência de descolamento prematuro de placenta normalmente inserida (DPPNI), segundo os dados do prontuário. A Figura 7(E) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 97,5% e o  $R^2=0,967$ .

Amostras de 59 gestantes potencialmente informativas (ii) foram testadas na qPCR com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs66501513, e 47 amostras apresentaram amplificação (Tabela 13). A eficiência da reação foi 65,9% e o  $R^2=0,961$ . O

controle negativo da reação (ii) apresentou amplificação na duplicata, com Ct=37,06 e Ct=38,56. Dessa forma, os resultados das quantificações com estes *primers* não foram incluídos na análise final de cffDNA.

Tabela 13. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs66501513. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R rs66501513				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	12	1,172	7,637	3,202(2,07-3,64)	3,19(1,68)
2º Trimestre	09	0,398	22,964	2,521(1,11-3,12)	4,41(7,04)
3º Trimestre	14	0,554	5,149	2,855(1,42-3,42)	2,58(1,35)

### Locus rs72083748

Foram testadas 24 amostras de gestantes potencialmente informativas com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs72083748. Entretanto, o limite de detecção da curva foi de 0,31ng. Dessa forma, não foi possível amplificar nenhuma amostra com esses *primers*.

A amplificação com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs72083748, foi realizada com amostras de 62 gestantes potencialmente informativas (ii) e 31 amostras apresentaram amplificação. A Figura 9(B) apresenta a curva-padrão e curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A eficiência da reação foi 70,8% e o  $R^2=0,963$ . A Tabela 14 apresenta os resultados das amostras quantificadas.

Tabela 14. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs72083748. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R rs72083748				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	11	0,202	1,824	0,828(0,371-1,068)	0,79(0,51)
2º Trimestre	14	0,088	1,426	0,403(0,263-0,581)	0,51(0,39)
3º Trimestre	06	0,212	1,891	0,452(0,282-0,876)	0,70(0,64)

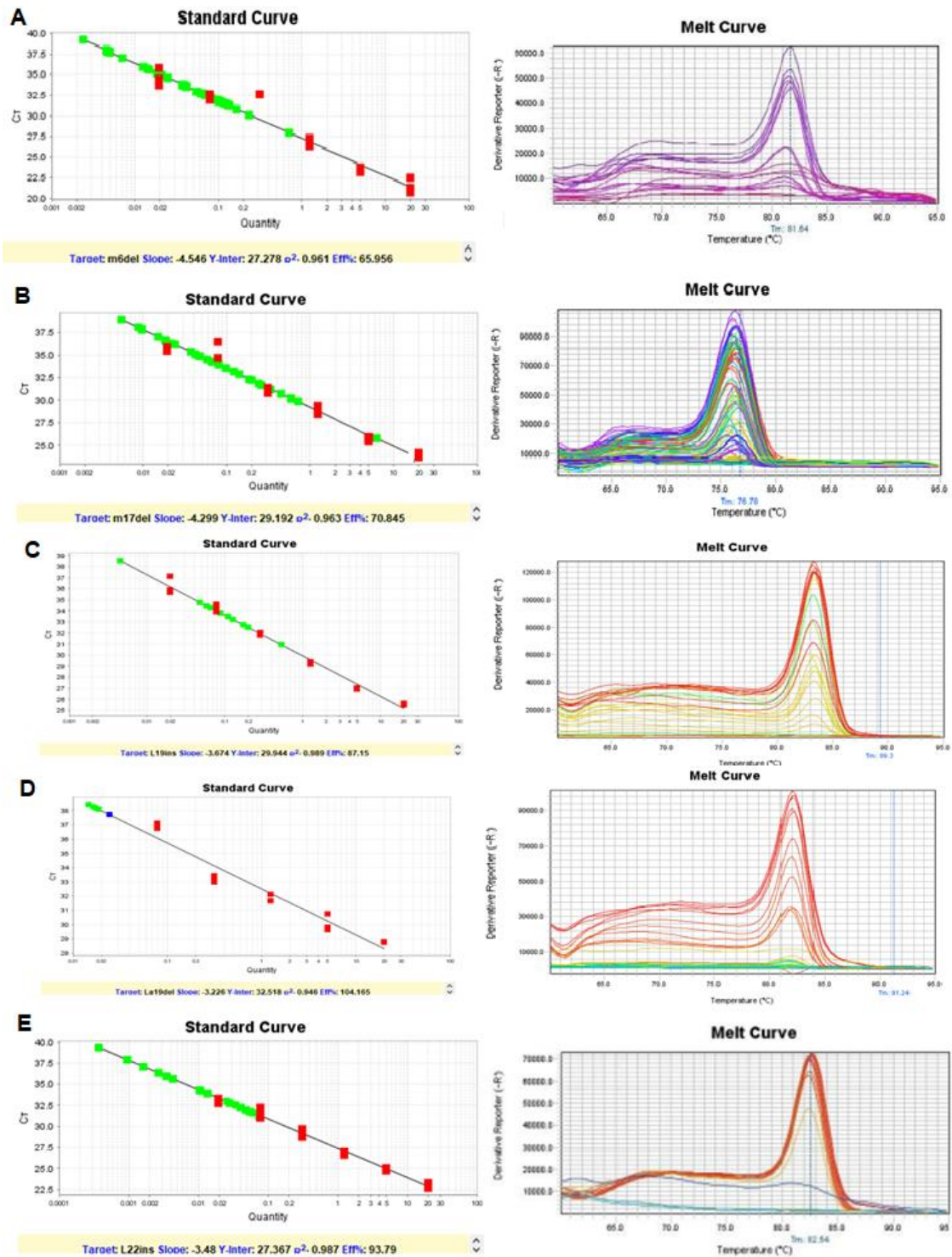


Figura 8.(A) Curva-padrão com diluições seriadas (pontos vermelhos) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados (curva de melting) com primers (A) deleção-específico/flanqueador do locus rs66501513 (B) deleção-específico/flanqueador do locus rs72083748 (C) inserção-específico/flanqueador do locus rs148112183 (D) deleção-específico/flanqueador do locus rs148112183 e (E) inserção-específico/flanqueador do locus rs67519581.

### Locus rs148112183

Amostras de 22 gestantes potencialmente informativas (dd) foram testadas na qPCR com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs148112183, e 10 amostras apresentaram amplificação. A eficiência da reação foi 87,15% e o  $R^2=0,989$ . Assim como ocorreu na etapa de padronização, ocorreu amplificação inespecífica nos indivíduos dd (controle negativo), gerando um Ct entre 37 e 38. Os resultados das amostras informativas encontra-se na Tabela 15. Entretanto, dada a inespecificidade dos *primers*, não utilizamos os resultados obtidos com esse marcador nas próximas etapas.

Tabela 15. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs148112183. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com primers Fi/R (rs148112183)				
	n	cffDNA rs148112183 (ng/mL de plasma)			
min		máx	mediana (IQR)	média (DP)	
1º Trimestre	01	9,575	9,575	9,575	9,575
2º Trimestre	05	1,043	12,771	3,543(1,97-5,11)	4,88(4,67)
3º Trimestre	04	0,080	3,090	1,921(1,19-2,48)	1,74(1,27)

Amostras de 46 gestantes potencialmente informativas (ii) foram testadas na qPCR com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs148112183 (Figura 8D). A eficiência da reação foi de 104,1% e o  $R^2=0,946$ . Entretanto, o limite de quantificação da curva foi de 0,078ng. Todas as amostras que amplificaram ficaram fora do limite de quantificação. Não houve amplificação nos controles negativos.

### Locus rs67519581

A reação de qPCR com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs67519581, foi realizada com 32 amostras de gestantes potencialmente informativas (dd) e 12 amostras apresentaram amplificação (Tabela 16). A eficiência da reação foi 93,7% e o  $R^2=0,987$  (Figura 8E).

Tabela 16. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs67519581. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fi/R (rs67519581)				
	n	cfdDNA (ng/mL de plasma)			
		min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	2	0,240	0,509	0,375(0,308-0,442)	0,37(0,18)
2º Trimestre	6	0,187	0,995	0,486(0,204-0,927)	0,55(0,39)
3º Trimestre	4	0,239	0,994	0,924(0,718-0,977)	0,77(0,35)

Amostras de 50 gestantes potencialmente informativas (ii) foram testadas na qPCR com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs67519581 e 16 amostras apresentaram amplificação. A eficiência da reação foi 83,0% e o  $R^2=0,947$  (Figura 9A). Devido a amplificação inespecífica nos indivíduos ii (controle negativo), com um Ct de 37, os resultados obtidos com esses *primers* (Tabela 17) não foram utilizados nas próximas etapas.

Tabela 17. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs67519581. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R (rs67519581)				
	n	cfdDNA (ng/mL de plasma)			
		min	Máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	5	6,201	22,839	7,262(6,52-17,86)	12,13(7,7)
2º Trimestre	7	2,558	23,879	5,460(4,04-8,63)	8,18(7,5)
3º Trimestre	4	5,153	10,497	10,301(8,94-10,41)	9,06(2,6)

### Locus rs151001596

A reação de qPCR com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs151001596, foi realizada com 20 amostras de gestantes potencialmente informativas (dd) e 09 amostras apresentaram amplificação (Tabela 18). A eficiência da reação foi 98,5 % e o  $R^2=0,864$  (Figura 9B).

Tabela 18. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs151001596. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fi/R (rs151001596)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	2	0,158	1,995	1,076(0,61-1,53)	1,0(1,29)
2º Trimestre	5	0,06	0,501	0,112(0,08-0,25)	0,20(0,18)
3º Trimestre	2	0,08	0,126	0,106(0,09-0,11)	0,10(0,02)

A quantificação com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs151001596, em 61 mães potencialmente informativas (ii) resultou na amplificação de 20 amostras (Tabela 19). A eficiência da reação foi 75,3% e o  $R^2=0,955$  (Figura 9C).

Tabela 19. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R) do locus rs151001596. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R rs151001596				
	n	min	Máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	7	0,148	1,219	0,492(0,33-0,64)	0,53(0,33)
2º Trimestre	4	0,082	0,964	0,481(0,37-0,60)	0,50(0,36)
3º Trimestre	9	0,071	2,640	0,402(0,30-1,09)	0,89(0,98)

### Locus rs1610941

A reação de qPCR com os *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R), do locus rs1610941, foi realizada com 61 amostras de gestantes potencialmente informativas (dd) e 14 amostras apresentaram amplificação (Tabela 20). A eficiência da reação foi 99,0%% e o  $R^2=0,959$  (Figura 9D).

Tabela 20. Resultado da quantificação com *primers* inserção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs1610941. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fi/R rs1610941				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	6	0,192	0,579	0,389(0,23-0,42)	0,36(0,14)
2º Trimestre	5	0,221	1,705	0,428(0,29-0,61)	0,65(0,60)
3º Trimestre	3	0,174	2,089	0,789(0,48-1,43)	1,01(0,97)

A quantificação com os *primers* deleção-específico/flanqueador (Fd/R), do locus rs1610941, em 21 mães potencialmente informativas (ii) resultou na amplificação de 4 amostras (Tabela 21). A eficiência da reação foi 82,5% e o  $R^2=0,985$  (Figura 9E).

Tabela 21. Resultado da quantificação com *primers* deleção-específico/flanqueador (Fi/R) do locus rs1610941. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	Quantificação com <i>primers</i> Fd/R (rs1610941)				
	n	min	máx	mediana (IQR)	média (DP)
1º Trimestre	2	0,380	0,553	0,467(0,42-0,51)	0,46(0,12)
3º Trimestre	2	0,863	1,057	0,960(0,91-1,00)	0,96(0,13)



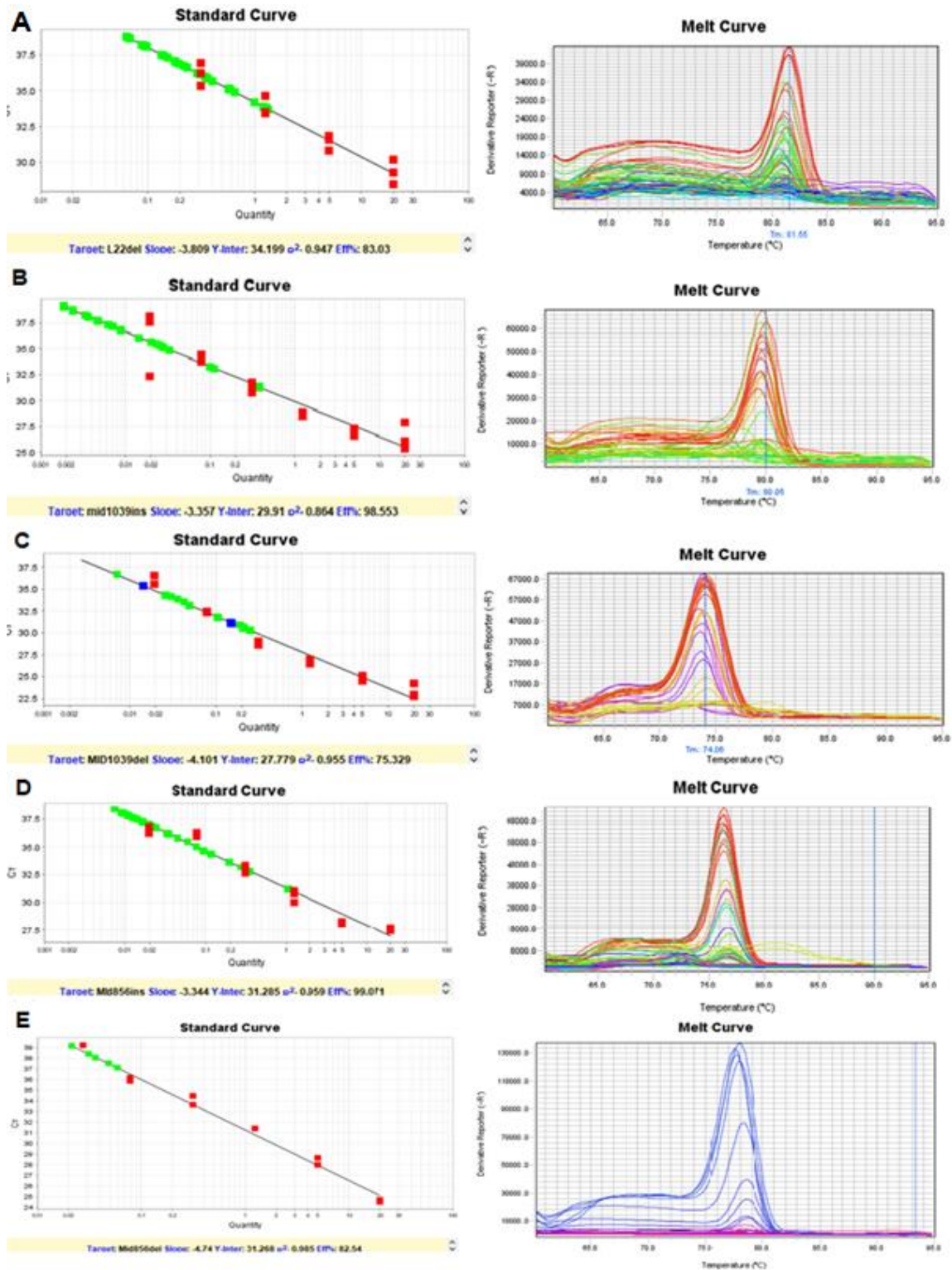


Figura 9. Curva-padrão com diluições seriadas (pontos em vermelho) e amostras amplificadas (pontos verdes) e curva de dissociação dos fragmentos amplicados (curva de melting) com primers (A) deleção-específico/flanqueador do locus rs67519581 (B) inserção-específico/flanqueador do locus rs151001596 (C) deleção-específico/flanqueador do locus rs151001596 (D) inserção-específico/flanqueador do locus rs1610941 (E) deleção-específico/flanqueador do locus rs1610941.

## 6.7 Quantificação da fração de DNA fetal com marcadores InDels

A fração fetal (%) foi calculada pela razão entre a quantidade de DNA fetal circulante, estimada com os marcadores InDels, e a quantidade de DNA total circulante no plasma, obtida com a  $\beta$ -globina (Tabela 22). O teste de Kruskal-Wallis mostrou que há diferenças na fração fetal entre os trimestres gestacionais ( $X^2_{(2)}=7,444$ ,  $p<0,05$ ). O post-hoc de Dunn mostrou que a fração de cffdna no 3º trimestre gestacional (18,9 e 14,2, mediana e amplitude interquartil) é diferente daquela observada no 1º trimestre gestacional ( $p_{ajus}=0,0196$ ). Nosso painel de InDels foi informativo em 64% das amostras. Não foi possível estimar a fração fetal em 59 das 164 amostras coletadas, por não serem informativas em nenhum dos lócus InDels utilizados para quantificação ou por estar abaixo do limite de quantificação da reação de qPCR.

Tabela 22. Fração fetal (%) estimada ao longo dos trimestres gestacionais, com marcadores InDels. n= número de amostras, IQR= intervalo interquartil, DP= desvio-padrão.

Trimestre Gestacional	n	Fração de cffdna (%)			média (DP)
		min	máx	mediana (IQR)	
1º Trimestre	43	1,03	29,9	10,9 (5,3-17,3)	12,78(7,9)
2º Trimestre	34	1,99	34,2	14,3(7,0-26,3)	16,36(10,6)
3º Trimestre	28	4,25	65,7	18,9(13,3-27,5)	21,27(13,9)
Total	105	1,03	65,7	14,7(6,8-22,1)	16,20(11,0)

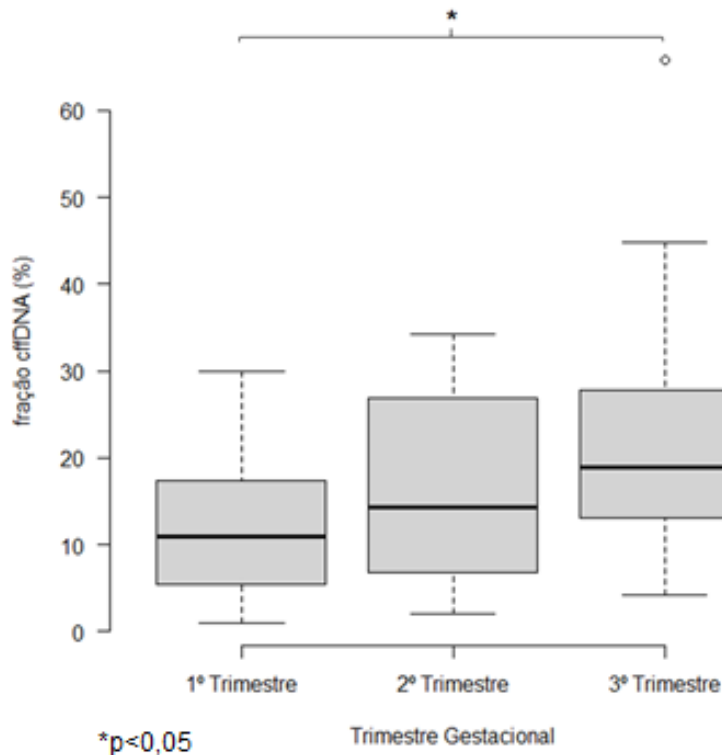


Figura 10. Boxplot com distribuição dos resultados da fração de DNA fetal (%) nos trimestres gestacionais.

#### 6.9 Características maternas e fração fetal

Foi construído um modelo de regressão linear simples, com a fração fetal como variável dependente e a idade gestacional como variável independente (modelo 1). Foi realizada a transformação Box-Cox dos dados da fração fetal ( $\lambda = 0,3$ ) e os resíduos do modelo foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ( $W = 0,982$ ,  $p = 0,184$ ) e quanto a homocedasticidade pelo teste de Breusch-Pagan ( $BP = 0,47505$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,490$ ). Os resíduos do modelo também foram analisados graficamente quanto a linearidade, normalidade, homocedasticidade e presença de *outliers*. A regressão linear mostrou que há associação positiva entre a fração de DNA fetal circulante no plasma materno e a idade gestacional (Figura 11,  $p = 0,0018$  [IC 95%, 0,017–0,077]).

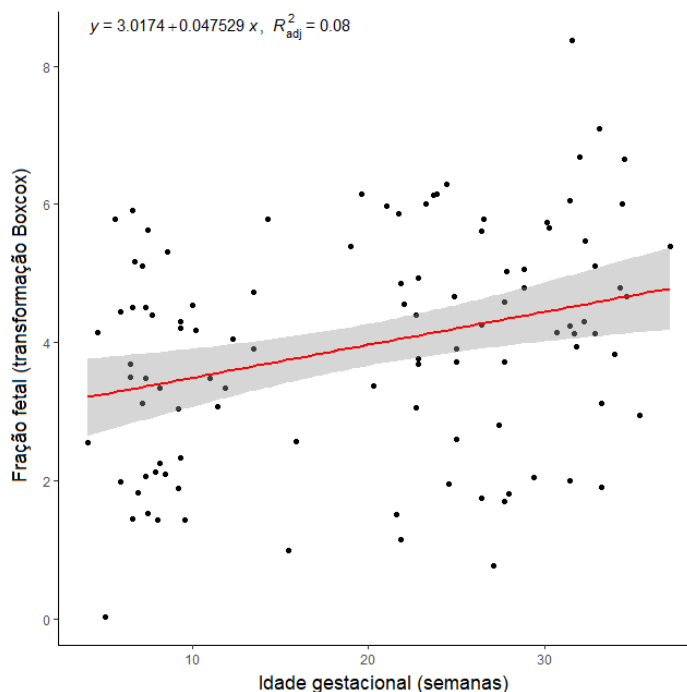


Figura 11. Modelo de regressão linear com associação positiva entre a fração fetal circulante e a idade gestacional.

Foram construídos também modelos de regressão linear múltipla, para avaliar o efeito das características maternas na fração fetal, adicionando ao modelo inicial (modelo1) as variáveis IMC (modelo 2), ancestralidade europeia (modelo 3), ancestralidade amereríndea (modelo 4) e ancestralidade africana (modelo 5). Foi realizada a transformação Box-Cox dos dados da fração fetal ( $\lambda = 0,3$ ) e os resíduos do modelo foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (modelo 2:  $W = 0,982$ ,  $p = 0,193$ ; modelo 3:  $W = 0,983$ ,  $p = 0,204$ ; modelo 4:  $W = 0,982$ ,  $p = 0,190$ ; modelo 5:  $W = 0,982$ ,  $p = 0,175$ ) e a homocedasticidade pelo teste de Breusch-Pagan (modelo 2:  $BP = 0,790$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,673$ ; modelo 3:  $BP = 0,834$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,659$ ; modelo 4:  $BP = 4,82$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,0898$ ; modelo 5:  $BP = 1,409$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,494$ ). Entretanto, nenhuma das características maternas testadas (IMC, ancestralidade europeia, ameríndia e africana) foi associada estatisticamente à fração de DNA fetal circulante (Tabela 23).

Tabela 23. Modelos de regressão linear testados para associação de características maternas com a fração fetal circulante.

Modelos de regressão linear	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<i>Intercept</i>	3,017	3,296	3,174	2,915	2,899
Idade gestacional (IG)	0,047*	0,047*	0,048*	0,048*	0,047*
IMC		-0,010			
Ancestralidade EUR			-0,419		
Ancestralidade AME				0,380	
Ancestralidade AFR					0,328
R <sup>2</sup>	0,089	0,088	0,094	0,091	0,091

AFR = africana; EUR = europeu; AME = ameríndia.

Variável dependente: Fração fetal transformada

\*p<0,01

#### 6.10 Quantificação com SRY e comparação com marcadores Indels

Das 164 amostras coletadas, 55 eram gestantes com feto masculino, 74 com feto feminino e 35 não havia registros nos prontuários do sexo fetal. Todas as amostras foram testadas com *primers* para sequencia do gene SRY. Não houve amplificação das amostras de gestantes com feto feminino. Houve amplificação em 40 das 55 amostras das gestantes com feto masculino. A eficiência da reação com o SRY foi de 79,5% e o R<sup>2</sup>= 0,916.

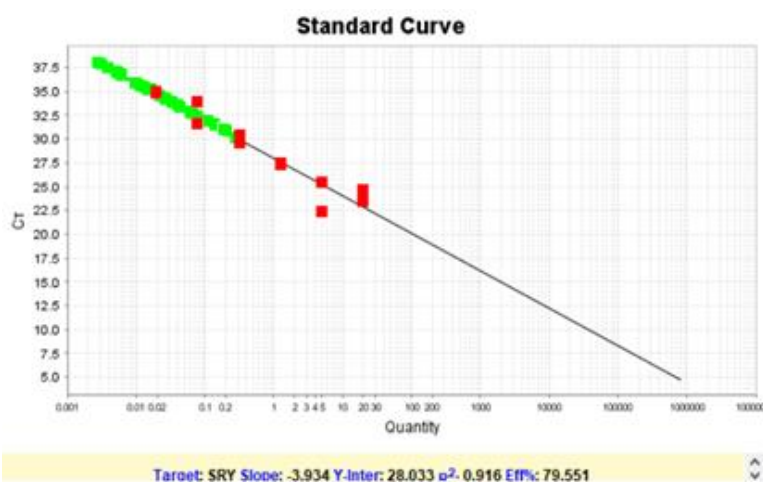


Figura 12. Curva de eficiência com os primers para sequencia do gene SRY.

As quantificações obtidas com o SRY foram comparadas com as dos marcadores indels (n=22). A correlação de Spearman mostrou que há uma correlação positiva

e forte ( $\rho=0,77$ ,  $p<0,001$ ) entre as quantificações (Figura 13). O gráfico de Bland-Altman apresenta a concordância entre os dois marcadores (Figura 13).

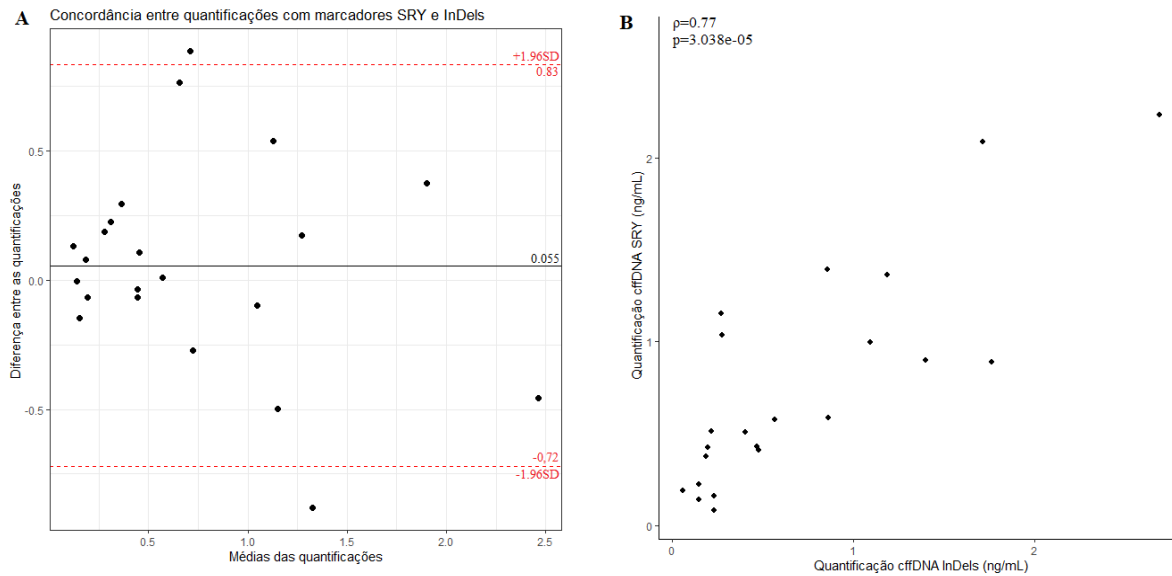


Figura 13. (A) Gráfico de Bland-Altman:concordância entre as quantificações pelos marcadores Indels e SRY. A linha preta horizontal representa a média das diferenças, ou viés (=0,055) entre os dois métodos, e as linhas horizontais vermelhas pontilhadas mostram os limites superior e inferior de concordância de 95% (=viés  $\pm$  1,96 $\times$ s) (B) Gráfico de dispersão e Correlação de Spearman entre marcadores indels e SRY ( $\rho$  = coeficiente de correlação de Spearman).

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Padronização dos primers InDels e parâmetros de qualidade da qPCR

A eficiência das reações de qPCR é calculada a partir da declividade ou *slope* da curva-padrão. Em uma reação ideal, a eficiência é 1 ou 100%, ou seja, o alvo dobra a cada ciclo durante a fase exponencial da reação, o que corresponde a uma inclinação de -3,32. Segundo recomendações do fabricante, para obtenção de resultados precisos e reprodutíveis, as reações de qPCR devem ter eficiência entre 90% e 110% (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Embora todas as reações de padronização dos *primers* (Tabela 7) tenham apresentado eficiência adequada, nas curvas para quantificação do *cffDNA*, a eficiência dos *primers* inserção-específico/flanqueador dos locos rs138730495 (82,3%), rs111797680 (89,5%) e deleção-específico/flanqueador dos locos rs72083748 (70,8%), rs1510015996 (75,3%), rs1610941 (82,5%) ficaram abaixo do desejável. O mesmo aconteceu com a reação de quantificação com os primers do SRY (79,5%) e  $\beta$ -globina (85,3%). Também apresentaram eficiência baixa os *primers* deleção-específico/flanqueador do locus rs66501513 (65,9%) e inserção-específico/flanqueador do rs148112183 (70,8%) e porém, estes últimos marcadores não foram incluídos nos resultados finais, devido a inespecificidade das reações.

Segundo a LIFE TECHNOLOGIES, (2014), fatores como o comprimento e conteúdo de GC do *amplicon* e o uso de reagentes em concentrações não ideais pode resultar em eficiência abaixo de 90%. Entretanto, considerando que as eficiências durante as reações de padronização estavam dentro da faixa desejável e que foram utilizadas as mesmas condições de amplificação (concentrações de *primers*, reagentes e temperatura) na padronização e na quantificação das amostras, acreditamos que a queda na eficiência das reações não tenha sido causada por condições não ideais de reagentes.

Uma possível explicação poderia ser a baixa quantidade de DNA utilizada nas reações de quantificação, com diluições de 20ng a 0,01ng. Uma melhoria na inclinação da curva padrão e, conseqüentemente, na eficiência da reação, pode ser alcançada excluindo pontos extremos da curva (LIFE TECHNOLOGIES, 2014), como a última diluição, com baixa quantidade de DNA. Entretanto, no caso de

reações para quantificação de material residual, em baixas concentrações, como o cffDNA, este recurso não pode ser aplicado, pois a curva-padrão deve abranger toda a faixa de concentração esperada nas amostras desconhecidas.

O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) reflete o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear e os valores individuais de Ct das amostras padrão. Os valores de  $R^2$  das curvas de eficiência de todos os *primers* ficaram entre 0,861 e 0,993 na padronização e entre 0,864 e 0,989 nas curvas de quantificação do cffDNA, assim como da  $\beta$ -globina (0,994) e o SRY (0,916), indicando linearidade e reprodutibilidade dos resultados.

A curva de dissociação dos fragmentos amplificados apresentou um pico de *melting* correspondente à amplificação de um fragmento em cada um dos lócus analisados. A curva de dissociação é um método de verificar a formação de produtos inespecíficos, como dímeros de *primers*, auxiliando a averiguar a especificidade das reações de qPCR. Uma vez que a temperatura de dissociação dos ácidos nucleicos é determinada pelo comprimento do *amplicon* e teor de GC, diferentes produtos de PCR podem ser distinguidos por suas temperaturas de *melting* ( $T_m$ ). Cada par de *primers* inserção-específicos/flanqueador e deleção-específico/flanqueador apresentou uma  $T_m$  específica, conforme esperado para sequências de composição e tamanhos distintos.

Nas reações de padronização com os *primers* deleção-específico/flanqueador dos InDels rs66501513 e rs67519581 e inserção-específico/flanqueador do InDel rs148112183, o controle negativo (DNA in/in ou del/del) com *input* de 20ng gerou um Ct próximo a 37, ou acima, que é bastante elevado em relação aos Cts obtidos nas reações positivas. Devido a essa diferença, estes lócus foram mantidos nas análises neste primeiro momento. Entretanto, posteriormente, nas reações de quantificação com as amostras de plasma das gestantes, este resultado permaneceu e tornou-se impossível distinguir entre uma amostra com Ct elevado devido a baixa quantidade de material fetal e uma amostra com amplificação inespecífica. Desta forma, os resultados obtidos com estes *primers* não são confiáveis e foram retirados da análise final. Os demais *primers* apresentaram especificidade adequada para as reações de quantificação.



## 7.2 Determinação fenotípica e parâmetros populacionais

As amplificações por PCR Convencional, com os *primers* flanqueadores à inserção, geraram bandas nítidas e alelos com migração eletroforética dentro da região e tamanho esperados de cada produto amplificado. Nossos resultados confirmam a especificidade já descrita dos *primers* utilizados (NG, 2015; RODRIGUES, 2018; SANTOS, 2014a). O marcador rs111797680 foi o único a apresentar desvio das proporções esperadas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a um déficit de heterozigotos. O desequilíbrio com déficit de heterozigotos, pode ocorrer devido a erros de genotipagem, amplificação preferencial de um alelo, ou ainda, devido ao casamento não aleatório.

## 7.3 Quantificação do DNA total ( $\beta$ -globina)

A mediana da concentração de DNA total circulante no plasma materno encontrada no primeiro (3,98 ng/mL ou 604,2 GE/mL), segundo (4,14ng/mL ou 627,9 GE/mL) e terceiro trimestre (3,84 ng/mL ou 583,2 GE/mL) foi menor em relação aquela descrita por LO et al.(1998), que encontrou uma mediana de 975 GE/mL, em 25 mães com idade gestacional entre 11-17 semanas, e 4313 GE/mL em 25 gestantes entre 37-43 semanas, utilizando o mesmo marcador ( $\beta$ -globina). Os mesmos autores também descrevem um aumento na quantidade de DNA plasmático à medida que a gravidez progride, o que não foi observado na nossa amostra.

Nossos resultados assemelham-se aqueles encontrados por encontrados por CHAN et al.(2003), que descreveu uma concentração mediana do gene  $\beta$ -globina de 668 GE/mL (IQR= 491-1049 GE/mL) em gestantes do último trimestre, e por (HORINEK et al., 2008) e BIRCH et al., (2005) em gestantes do 1º e 3º trimestres. Neste último trabalho, o DNA total livre plasmático foi amplificado com sequências GADPH, por qPCR, obtendo-se uma concentração mediana de 577,97 GE/mL (156.5–1024.6 GE/mL) no 1º trimestre, 358.05 GE/mL (198–1292.3 GE/mL) no 2º trimestre e 601.14 GE/mL (249.8–1761 GE/mL), no 3º trimestre. Não houve evidências estatísticas de relação entre a idade gestacional e o a concentração de DNA total no plasma. HORINEK et al. (2008) também não encontrou diferenças estatísticas nas concentrações de DNA total entre os trimestres gestacionais, ao analisar 238 gestantes, por qPCR, com amplificação da sequência de GADPH.

ZHONG et al., (2000) descreveram que os níveis totais de DNA circulatório não são constantes e variaram consideravelmente tanto na circulação de gestantes saudáveis como de não-gestantes saudáveis. Em não gestantes, a quantidade total de DNA livre de células flutuou em média 13,5 vezes e em amostras de gestantes, a quantidade DNA livre de células variou em média 21,5 vezes, após a coleta consecutiva de amostras de sangue ao longo de 3 dias.

Diferenças nas concentrações de DNA total circulante são determinadas principalmente pela concentração de DNA materno e pode ser atribuível à variação inerente entre os indivíduos, refletindo maior ou menor eliminação de células ou apoptose na gravidez (BIRCH et al., 2005).

A concentração de DNA circulante varia significativamente entre publicações (AUCAMP et al., 2018). Para BRONKHORST; AUCAMP; PRETORIUS, (2015), a análise do DNA circulante ainda não foi introduzida na prática clínica devido a falta de conhecimento sobre a origem e função desse material, caracterização molecular insuficiente e ausência de consenso analítico.

#### 7.4 Ancestralidade

A composição ancestral estimada da nossa amostra, de gestantes brasileiras do município de Ribeirão Preto, apresentou, conforme esperado, maior composição ancestral europeia (40,7%), seguida da africana (35,5%) e ameríndia (23,9%). Nossa amostra apresentou menor composição europeia e maior composição africana e ameríndia que aquelas descritas para região Sudeste brasileira e para o estado de São Paulo.

MOURA et al. (2015) em uma metanálise incluindo 25 estudos, descreveu a região sudeste brasileira com contribuição europeia de 67%, 23% de africana e 10% de ameríndia. Os autores relatam que as proporções variam muito entre as populações brasileiras: indivíduos da região Nordeste tiveram a maior contribuição africana (27%) enquanto os indivíduos da região Norte tiveram maior contribuição ameríndia (32%).

MANTA et al. (2013) estimaram a composição ancestral no Estado de São Paulo de 62,9% europeia, 25,5% africana e 11,6% ameríndia. Além da variação encontrada entre as populações de todo o país, estes autores ressaltam também a enorme

diversidade que pode ser encontrada entre indivíduos da mesma população em termos das três contribuições étnicas diferentes. Uma vez que a nossa amostra constitui-se de gestantes atendidas em uma única região do município de Ribeirão Preto, é possível que esta seja a causa das diferenças encontradas nas proporções ancestrais em relação aquelas descritas para o estado ou país, como um todo.

#### 7.5 Quantificação da fração fetal no plasma materno

A mediana da fração fetal encontrada no presente trabalho com marcadores InDels foi 10,0%, 14,3% e 18,9%. Nossos resultados concordam com aqueles descritos na literatura para os três trimestres gestacionais. HORINEK et al. (2008) descreveu fração fetal foi estimada em 9,7%; 9,0% e 20,4% no primeiro, segundo e terceiro trimestres, respectivamente, utilizando *primers* para amplificação de seqüências ZFX e ZFY. Em 22384 gestantes, avaliadas com o Kit pré-natal para triagem de trissomias Harmony™ (Ariosa Diagnostics), a fração média de cfDNA mensurada na 10ª semana gestacional foi de 10,2% (WANG et al., 2013).

Nossos resultados demonstraram, portanto, que houve um aumento na fração fetal ao longo da gestação, mas esse aumento só teve com evidência estatística na comparação entre o 1º e o 3º trimestre gestacional. A regressão linear também mostrou que há associação positiva entre a fração de DNA fetal circulante no plasma materno e a idade gestacional (Figura 11,  $p=0,0018$  [IC 95%, 0,017–0,077]). Encontramos uma fração fetal mediana de 14,7% considerando todo período gestacional (gestantes entre 4 e 37 semanas de gestação) e em 75% das quantificações, a fração fetal ficou entre 6,8% e 22,1%. Segundo BARRETT et al. (2017), a concentração de DNA fetal livre de células no plasma é de aproximadamente 15%, mas pode variar de menos de 4% a mais de 30%. SCOTT et al. (2018) mensurou a fração fetal de 5103 gestantes utilizando o Kit pré-natal para triagem de trissomias Harmony™ e encontrou uma variação 4,0% a 37,0%, com média de 11,6% (DP 4,3%).

ZHONG et al. (2000) quantificou o DNA fetal, por qPCR, com marcador específico para o cromossomo Y e descreveu flutuações tanto na quantidade de DNA total circulante, como na de DNA fetal, em uma ampla gama de idades gestacionais. Segundo esses autores, os níveis de DNA fetal variaram durante toda a gravidez e

alterações na quantidade de DNA fetal circulante ocorrem de maneira independente da variação na quantidade do DNA materno, em gestações saudáveis.

#### 7.6 Associação da fração fetal com características maternas

Em trabalhos prévios, a fração fetal já foi associada à ancestralidade materna. POON et al. (2013) encontraram concentração de DNA materno e fetal aumentada em mulheres de origem afro-caribenha e do leste asiático em relação às caucasianas.

Em uma análise de regressão, a raiz quadrada da fração fetal foi significativamente associada à origem afro-caribenha em 1949 gestantes entre 11-13 semanas de gestação (ROLNIK et al., 2018a).

No presente trabalho, ancestralidade materna (europeia, africana e ameríndia), avaliada por meio de três modelos de regressão linear múltipla independentes ajustados pela idade gestacional (modelos 3, 4 e 5, respectivamente), não foi associada estatisticamente à fração de DNA fetal circulante. Em nosso trabalho, a inferência da ancestralidade materna foi realizada a partir de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs). A associação da ancestralidade com a fração fetal também não havia sido investigada ainda em populações altamente miscigenadas como a brasileira.

Em nossa amostra, não houve evidências de associação do IMC materno com a fração fetal de DNA circulante, embora o  $\beta$  tenha sido negativo (-0,010) no modelo de regressão linear múltipla ajustado pela idade gestacional (modelo 2). Na literatura, há trabalhos que descrevem uma associação inversa entre o IMC e a fração fetal. ROLNIK et al. (2018) realizou um estudo transversal em gestantes, a partir das 10 semanas de gestação, para a triagem de cfDNA para aneuploidias fetais e os valores medianos da fração fetal foram menores, e as taxas de falha no teste foram maiores, com o aumento do IMC ( $p=0,001$ ). Mulheres com IMC de 35 ou mais tiveram um aumento significativamente menor na fração fetal (0,1 vs 0,3 unidades/semana,  $P=0,001$ ), em relação a mulheres com IMC normal. Os autores concluem que o aumento da fração fetal ao longo da gravidez em mulheres com IMC igual ou superior a 35 é mínima.

Em um estudo mais recente com gestantes do primeiro trimestre ( $\leq 14$  semanas), o IMC materno correlacionou-se com a fração fetal mas não com o DNA total (SHREE

et al., 2021). A associação inversa entre a fração fetal e peso materno pode ser atribuído a uma aceleração no turnover de adipócitos em gestantes obesas e consequente aumento na liberação de DNA livre de origem materna na circulação, resultando em uma menor proporção de cfDNA (HAGHIAC et al., 2012; HUI; BIANCHI, 2020a).

### 7.7 Comparação dos marcadores InDels com SRY

Os resultados dos InDels foram comparados com os resultados obtidos com SRY, uma vez que a quantificação com sequências para o cromossomo Y é considerado o método padrão para quantificação de cfDNA. A correlação de Spearman mostrou que há uma forte correlação positiva ( $\rho=0,77$ ,  $p<0,001$ ) entre as quantificações obtidas com marcadores InDels e com SRY.

Resultado semelhante foi descrito por BARRETT et al. (2017), na comparação da fração fetal obtida com marcadores InDels e sequenciamento completo do cromossomo Y ( $\rho = 0,69$ , Correlação de Spearman), utilizando um painel de 35 polimorfismos de inserção/deleção multiplexados por sequenciamento direcionado.

Alta correlação entre a quantificação com sequências específicas do cromossomo Y e o método baseado na metilação ( $\rho=0,85$ ,  $p<0,001$ , Correlação Pearson) também foi descrita por NYGREN et al. (2010), que desenvolveram uma abordagem para analisar regiões que estão hipermetiladas na placenta em relação ao sangue materno e assim, avaliar a porção fetal do DNA circulante isolado do plasma materno.

Entretanto, na comparação entre dois métodos quantitativos, BLAND e ALTMAN, (1986) afirmam que o teste de correlação mede apenas a força da relação entre duas variáveis e não a concordância entre elas. Um coeficiente de correlação alto significa, de uma forma geral, que os maiores valores para um método também serão para o outro, assim como os menores valores. Quando pretende-se avaliar a concordância entre dois métodos é necessário incluir os limites de concordância e avaliar se os limites encontrados são diferenças aceitáveis do ponto de vista clínico (HIRAKATA; CAMEY, 2009). Na análise gráfica de Bland-Altman (Figura 13), um gráfico de dispersão, relacionando as médias dos dois métodos no eixo x, com o viés (diferença entre eles), no eixo y, podemos observar que a maioria dos

valores estão distribuídos dentro dos limites superior e inferior ( $\pm 2SD$ ) e que a diferença média entre os marcadores (viés) foi um valor baixo (0,055) e próximo de zero, indicando concordância entre as quantificações.

## 7.8 Informatividade dos marcadores InDels

Na quantificação com marcadores InDels é possível detectar o DNA fetal em meio a quantidade massiva de material genético da mãe, porque utilizamos *primers* específicos direcionados à amplificação de um alelo exclusivo fetal.

Dessa forma, a probabilidade de que um locus InDel seja informativo na quantificação de DNA fetal circulante é dada por:

$$\text{Probab}(\text{inf} | \text{gestante}) = pq$$

Quando a mãe é homozigota para um determinado alelo ( $p^2$  ou  $q^2$ ) e o filho apresenta um alelo exclusivo dele ( $q$  ou  $p$ , respectivamente), a probabilidade desse evento é dada pela equação:  $p^2 \times q + q^2 \times p$ . Simplificando, chega-se a  $pq$  (SOUZA, 2020).

De acordo com as frequências alélicas de cada marcador InDel (Tabela 6), esperavamos amplificação em 29 amostras com locus rs138730495, 41 amostras com locus rs 111797680, 38 amostras com o locus rs151001596 e 38 amostras também com o locus rs1610941, considerando as reações tanto com *primers* inserção-específicos/flanqueador como deleção-específicos/flanqueador. Na prática, observamos amplificação de 16 amostras com locus rs138730495, 48 amostras com locus rs 111797680, 29 amostras com o locus rs151001596 e 18 amostras com o locus rs1610941.

Nos locus rs72083748 foi utilizado apenas os *primers* deleção-específicos/flanqueador e no locus rs67519581 apenas os *primers* inserção-específicos/flanqueador, sendo esperado 24 e 18 amostras quantificadas, respectivamente. Na prática, observamos amplificação de 31 amostras (rs72083748) e 12 amostras (rs67519581).

Portanto, o número de amostras quantificadas não coincidiu exatamente com as quantidades esperadas, calculadas a partir das frequências alélicas. Muitas amostras não puderam ser quantificadas por ficarem abaixo do limite inferior da curva-padrão (limite de quantificação). Uma consideração importante ao detectar

números de cópias muito baixos é que a distribuição dos resultados não segue distribuição normal, mas sim a distribuição de Poisson (BIOSYSTEMS, 2016) . A distribuição de Poisson prevê que em um grande número de repetições, contendo uma média de uma cópia do *template*, em cerca de 37% das repetições não haverá detecção alguma, em 37% das repetições haverá detecção de uma cópia e em 18% das repetições haverá detecção de duas cópias. Essa imprecisão na detecção de baixo número de cópias interfere decisivamente na análise quantitativa, por isso o limite de quantificação é definido pelo último ponto (menor concentração) em que a linearidade da curva permanece inalterada.

Em relação a informatividade do nosso painel de InDels como um todo, o conjunto de marcadores foi informativo em 64% das amostras, uma vez que foram quantificadas 105 das 164 amostras coletadas. 59 amostras não foram quantificadas por não serem informativas em nenhum dos marcadores InDels ou pela quantificação estar abaixo do limite de quantificação da reação de qPCR. Essa é uma limitação do nosso painel e demonstra a necessidade de descrição de um conjunto maior de marcadores para análises futuras.

## 8.CONCLUSÃO

As condições laboratoriais de oito marcadores InDels, com *primers* inserção-específicos/flanqueador e deleção-específico/flanqueador, foram determinadas para quantificação por qPCR. Dentre os marcadores padronizados, os *primers* alelo específicos direcionados à inserção e à deleção dos lócus rs138730496, rs111797680, rs1610941 e rs15100159, e os *primers* direcionados à deleção dos lócus rs72083748 e rs67519581 apresentaram especificidade adequada para quantificação de cffDNA.

Devido a inespecificidade dos *primers* deleção-específico/flanqueador do InDel rs66501513 e *primers* inserção-específico/flanqueador dos lócus rs148112183 e rs67519581, os resultados obtidos com esses *primers* não foram utilizados nas análises e não são recomendados para uso futuro. Os *primers* inserção-específico/flanqueador dos lócus rs66501513 e rs72083748 e deleção-específico/flanqueador do lócus rs148112183 também não são recomendados, neste caso, por apresentarem um limite de quantificação acima do que é necessário para abranger uma amostra de DNA em baixas concentrações, como é o caso da quantificação de cffDNA.

A fração fetal no plasma sanguíneo materno, calculada pela razão entre a quantidade de DNA fetal (InDels) e a quantidade de DNA total ( $\beta$ -globina), foi estimada em 10,0%, 14,3% e 18,9%, nos sucessivos trimestres. Houve diferença estatística na fração fetal entre o 1º e 3º trimestre gestacional ( $\chi^2_{(2)} = 7,444$ ,  $p < 0,05$ ). Nosso painel de InDels foi informativo em 64% das amostras, com quantificação de 105 das 164 gestantes analisadas.

Quarenta das 55 amostras das gestantes com feto masculino foram quantificadas com *primers* para sequência do gene SRY. Houve concordância e forte correlação ( $\rho = 0,77$ ,  $p < 0,001$ ) entre as quantificações obtidas com SRY e marcadores InDels.

Há associação positiva entre a fração de DNA fetal circulante no plasma materno e a idade gestacional ( $p = 0,0018$  [IC 95%, 0,017–0,077]) e não houve relação entre a fração fetal, o IMC e a ancestralidade materna em nossa amostra.

Portanto, a utilização de *primers* InDels alelo-específicos possibilitou a quantificação do DNA fetal circulante no plasma das gestantes e a investigação do



efeito das características maternas na fração fetal. Dessa forma, nossa hipótese inicial pôde ser confirmada. A metodologia descrita aqui poderá ser empregada em situações do diagnóstico pré-natal não invasivo que exijam a análise quantitativa do DNA fetal, como na investigação de complicações gestacionais, ou ainda em qualquer contexto em que seja necessária a dosagem de misturas de DNA ou DNA residual, como no monitoramento do microquimerismo de pacientes transplantados.

## 9.REFERÊNCIAS

ABDELHALIM, R. M. et al. Circulating Maternal Total Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 20, n. 2, p. 135–149, abr. 2016.

ALBERRY, M. et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. **Prenatal Diagnosis**, v. 27, n. 5, p. 415–418, maio 2007.

ALBERRY, M. S. et al. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 200, n. 1, p. 98.e1–6, jan. 2009.

ALBERRY, M. S.; SOOTHILL, P. W. Non-invasive prenatal diagnosis: implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 13, n. 2, p. 84–90, abr. 2008.

ANSELEM, O. et al. Influence of ethnicity on the clinical and biologic expression of pre-eclampsia in the ECLAXIR study. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 115, n. 2, p. 153–156, nov. 2011.

ASHOOR, G. et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 41, n. 1, p. 26–32, jan. 2013.

AUCAMP, J. et al. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 93, n. 3, p. 1649–1683, ago. 2018.

BARRETT, A. N. et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 1026–1032, jun. 2012.

BARRETT, A. N. et al. Measurement of fetal fraction in cell-free DNA from maternal plasma using a panel of insertion/deletion polymorphisms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186771, 30 out. 2017.

BIANCHI, D. W. Fetomaternal cell traffic, pregnancy-associated progenitor cells, and autoimmune disease. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 959–975, dez. 2004.

BIOSYSTEMS, A. **Real-Time PCR: Understanding Ct Application Note**. , 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>>

BIRCH, L. et al. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 312–320, fev. 2005.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8476, p. 307–310, 8 fev. 1986.

BONILLA, C. et al. Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city. **Human Genetics**, v. 115, n. 1, p. 57–68, jun. 2004.

BORTOLINI, M. C.; SALZANO, FRANCISCO M. **Evolution And Genetics Of Latin American Populations**. [s.l.] CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2005.

BRAZOROTTO, A. S. P.; SIMÕES, A. L. Quantificação de DNA fetal por marcadores inserção/deleção no plasma de parturientes. 2017.

BRONKHORST, A. J.; AUCAMP, J.; PRETORIUS, P. J. Cell-free DNA: Preanalytical variables. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 450, p. 243–253, 23 out. 2015.

CAGNIN, N. F. SNPS DO GENE MC1R E A SUSCEPTIBILIDADE AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 2015.

CAUGHEY, A. B. et al. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 106, n. 1, p. 156–161, jul. 2005.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 126, n. 4, p. 455–476, ago. 2000.

CHAN, K. C. A. et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 2211–2218, dez. 2006.

CHAN, L. Y. S. et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 678–680, abr. 2003.

CHANG, J. J. et al. Reassessing the impact of smoking on preeclampsia/eclampsia: are there age and racial differences? **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e106446, 2014.

CONTRO, E.; BERNABINI, D.; FARINA, A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 21, n. 2, p. 125–135, abr. 2017.

COTTER, A. M. et al. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 2, p. 515–520, ago. 2004.

CROWLEY, A. et al. Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 27, n. 2, p. 174–179, fev. 2007.

DELLA RAGIONE, F. et al. Differential DNA methylation as a tool for noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) of X chromosome aneuploidies. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 12, n. 6, p. 797–807, nov. 2010.

DEVONSHIRE, A. S. et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 26, p. 6499–6512, out. 2014.

FERNANDO, M. R. et al. A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, n. 5, p. 418–424, maio 2010.

GALANTER, J. M. et al. Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002554, 8 mar. 2012.

GEROVASSILI, A. et al. Cell-free DNA levels in pregnancies at risk of sickle-cell disease and significant ethnic variation. **British Journal of Haematology**, v. 135, n. 5, p. 738–741, dez. 2006.

HAGHIAC, M. et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 11, p. 2213–2219, nov. 2012.

HERRERA, C. A. et al. Cell-free DNA, inflammation, and the initiation of spontaneous term labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 217, n. 5, p. 583.e1-583.e8, nov. 2017.

HIGUCHI, R. Simple and Rapid Preparation of Samples for PCR. Em: ERLICH, H. A. (Ed.). **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**. London: Palgrave Macmillan UK, 1989. p. 31–38.

HIRAKATA, V. N.; CAMEY, S. A. Análise de Concordância entre Métodos de Bland-Altman. **Clinical and Biomedical Research**, v. 29, n. 3, 2009.

HORINEK, A. et al. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 24, n. 1, p. 15–21, 2008.

HUANG, J. et al. A novel method for the analysis of 20 multi-Indel polymorphisms and its forensic application. **Electrophoresis**, v. 35, n. 4, p. 487–493, fev. 2014.

HUI, L.; BIANCHI, D. W. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. **Prenatal Diagnosis**, v. 40, n. 2, p. 155–163, 2020a.

HUI, L.; BIANCHI, D. W. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. **Prenatal Diagnosis**, v. 40, n. 2, p. 155–163, 2020b.

HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J. C. P. Apoptosis in the Trophoblast—Role of Apoptosis in Placental Morphogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 353–362, 1 set. 2004.

ISHIHARA, N. et al. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 1, p. 158–166, jan. 2002.

KAYSER, M. et al. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 5, p. 1580–1588, maio 2000.

KIM, J.-Y.; KIM, Y. M. Acute Atherosclerosis of the Uterine Spiral Arteries: Clinicopathologic Implications. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 49, n. 6, p. 462–471, nov. 2015.

KIM, S. K. et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. **Prenatal Diagnosis**, v. 35, n. 8, p. 810–815, 2015.

KIM, S. Y. et al. Early Prediction of Hypertensive Disorders of Pregnancy Using Cell-Free Fetal DNA, Cell-Free Total DNA, and Biochemical Markers. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 40, n. 4, p. 255–262, 2016.

KIMURA, M. et al. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. **Nagoya Journal of Medical Science**, v. 73, n. 3–4, p. 129–135, ago. 2011.

LAU, T.-W. et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 2141–2146, dez. 2002.

LIFE TECHNOLOGIES. **Real time PCR Handbook**. , 2014.

LO, Y. M. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 4, p. 768–775, abr. 1998.

LO, Y. M. et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 1, p. 218–224, jan. 1999.

LO, Y. M. D. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **The Lancet**, v. 350, n. 9076, p. 485–487, 16 ago. 1997.

LO, Y. M. D. et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 61, p. 61ra91, 8 dez. 2010.

- LUI, Y. Y. N. et al. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 421–427, mar. 2002.
- LUIZON, M. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 7, p. 329–334, jul. 2009.
- MANTA, F. S. DE N. et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75145, 20 set. 2013.
- MARTIN, A. et al. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. **Prenatal Diagnosis**, v. 34, n. 7, p. 685–691, jul. 2014.
- MILLS, R. E. et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. **Genome Research**, v. 21, n. 6, p. 830–839, jun. 2011.
- MOURA, R. R. DE et al. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council**, v. 27, n. 5, p. 674–680, 2015.
- MUÑOZ-HERNÁNDEZ, R. et al. Total and Fetal Circulating Cell-Free DNA, Angiogenic, and Antiangiogenic Factors in Preeclampsia and HELLP Syndrome. **American Journal of Hypertension**, v. 30, n. 7, p. 673–682, 1 jul. 2017.
- NACHMAN, M. W.; CROWELL, S. L. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. **Genetics**, v. 156, n. 1, p. 297–304, set. 2000.
- NG, A. **Marcadores Inserção/Deleção para Genotipagem Fetal não Invasiva**. Tese de Doutorado—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2015.
- NICOLAIDES, K. H. et al. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 6, p. 575–579, jun. 2013.
- NYGREN, A. O. H. et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 1627–1635, out. 2010.
- PAPANTONIOU, N. et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 7, p. 682–687, jul. 2013.
- PERTL, B. et al. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. **Human Genetics**, v. 106, n. 1, p. 45–49, jan. 2000.
- PHILLIPPE, M. Cell-free fetal DNA--a trigger for parturition. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 26, p. 2534–2536, 26 jun. 2014.

POON, L. C. Y. et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 33, n. 4, p. 215–223, 2013.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, jun. 2000.

RODRIGUES, M. L. D. B. **Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos indel e detecção alelo-específica**. Mestrado em Genética—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 21 dez. 2018.

ROLNIK, D. L. et al. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 45, n. 1, p. 106–111, jan. 2015.

ROLNIK, D. L. et al. Influence of Body Mass Index on Fetal Fraction Increase With Gestation and Cell-Free DNA Test Failure. **Obstetrics and Gynecology**, v. 132, n. 2, p. 436–443, ago. 2018a.

ROLNIK, D. L. et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 52, n. 6, p. 722–727, dez. 2018b.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103–106, 2008.

SALVIANTI, F. et al. Prospective evaluation of RASSF1A cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia. **Placenta**, v. 36, n. 9, p. 996–1001, set. 2015.

SANTOS, M. D. DOS. Marcadores Inserção/Deleção na identificação humana pré-natal por método não invasivo. 2014a.

SANTOS, M. D. D. **Marcadores Inserção/Deleção na identificação humana por métodos não invasivos**. Dissertação de Mestrado—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2014b.

SCOTT, F. P. et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 31, n. 14, p. 1865–1872, 18 jul. 2018.

SHREE, R. et al. Low fetal fraction in obese women at first trimester cell-free DNA based prenatal screening is not accompanied by differences in total cell-free DNA. **Prenatal diagnosis**, v. 41, n. 10, p. 1277–1286, set. 2021.

SHRIVER, M. D. et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 4, p. 957–964, abr. 1997.

SIFAKIS, S. et al. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 201, n. 5, p. 472.e1–7, nov. 2009.

SIFAKIS, S.; KOUKOU, Z.; SPANDIDOS, D. A. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 2367–2372, abr. 2015.

SIKORA, A. et al. Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 136–138, jan. 2010.

SILVA, M. C. F. et al. Development of two multiplex mini-sequencing panels of ancestry informative SNPs for studies in Latin Americans: an application to populations of the State of Minas Gerais (Brazil). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 4, p. 2069–2085, 19 out. 2010.

SILVER, R. et al. Cell-free total and fetal DNA in first trimester maternal serum and subsequent development of preeclampsia. **American journal of perinatology**, v. 34, n. 2, p. 191–198, jan. 2017.

SOUZA, J. F. G. D. **Genotipagem de marcadores do tipo InDel em uma amostra da população urbana brasileira**. Mestrado em Genética—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 30 set. 2020.

TAGLAUER, E. S.; WILKINS-HAUG, L.; BIANCHI, D. W. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. **Placenta**, v. 35 Suppl, n. Suppl, p. S64–68, fev. 2014.

TANAKA, M. et al. Racial disparity in hypertensive disorders of pregnancy in New York State: a 10-year longitudinal population-based study. **American Journal of Public Health**, v. 97, n. 1, p. 163–170, jan. 2007.

THURIK, F. F. et al. Absolute first trimester cell-free DNA levels and their associations with adverse pregnancy outcomes. **Prenatal Diagnosis**, v. 36, n. 12, p. 1104–1111, dez. 2016.

TSUI, D. W.; CHIU, R. W.; LO, Y. D. Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma. **Chimerism**, v. 1, n. 1, p. 30–35, 2010.

VAN BOECKEL, S. R. et al. Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 155, n. 3, p. R137–R145, 21 dez. 2017.

WAGNER, J. et al. Non-invasive prenatal paternity testing from maternal blood. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, n. 1, p. 75–79, jan. 2009.

WALKNOWSKA, J.; CONTE, F.; GRUMBACH, M. PRACTICAL AND THEORETICAL IMPLICATIONS OF FETAL/MATERNAL LYMPHOCYTE TRANSFER. **The Lancet**, v. 293, n. 7606, p. 1119–1122, 7 jun. 1969.

WANG, E. et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 7, p. 662–666, jul. 2013.



WANG, Q. et al. Real-time PCR evaluation of cell-free DNA subjected to various storage and shipping conditions. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 14, n. 4, p. 12797–12804, 19 out. 2015.

WATAGANARA, T. et al. Plasma gamma-globin gene expression suggests that fetal hematopoietic cells contribute to the pool of circulating cell-free fetal nucleic acids during pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 689–693, abr. 2004.

WEBER, J. L. et al. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 4, p. 854–862, out. 2002.

YU, H. et al. Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7571–7582, 8 abr. 2013.

ZHANG, M. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by dosage ratio of fetal chromosome-specific epigenetic markers in maternal plasma. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban**, v. 31, n. 5, p. 687, out. 2011.

ZHONG, X. Y. et al. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. **Obstetrics and Gynecology**, v. 96, n. 6, p. 991–996, dez. 2000.

## 10. APÊNDICES

APÊNDICE A. Lista dos genótipos de 164 gestantes analisadas na PCR convencional com primers flanqueadores de oito lócus InDels.

Amostra	Marcador InDel (F/R)							
	rs138730495	rs111797680	rs66501513	rs148112183	rs67519581	rs151001596	rs1610941	rs72083748
2	in/in	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del
4	in/in	in/in	in/del	del/del	in/del	del/del	del/del	in/in
5	in/del	in/in	del/del	in/del	in/in	in/in	in/in	in/del
6	in/del	in/del	del/del	in/in	del/del	in/in	in/del	in/in
7	in/in	in/del	del/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in
8	in/del	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del	del/del	in/in
9	in/in	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in
11	in/del	del/del	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del
13	in/del	del/del	in/del	del/del	in/in	in/in	in/del	in/del
14	in/in	in/in	del/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del
15	in/in	del/del	del/del	del/del	in/del	in/in	del/del	del/del
16	in/in	in/del	del/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del
17	in/in	in/in	in/in	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del
18	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in	in/in	in/del	del/del
19	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
20	del/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	del/del
21	in/del	in/del	in/del	in/in	in/in	in/del	del/del	in/del
22	in/in	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del
23	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	del/del	in/del
24	in/in	del/del	del/del	del/del	del/del	in/del	del/del	in/in
25	in/del	in/del	del/del	del/del	in/del	in/in	del/del	in/del
26	in/in	in/in	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in
27	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/in	del/del	in/in
28	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/in
29	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/in
30	in/del	in/in	in/del	na	in/in	in/del	in/del	del/del
31	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in
32	in/del	del/del	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del
33	in/in	del/del	in/del	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del
34	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	in/del	in/in
36	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in

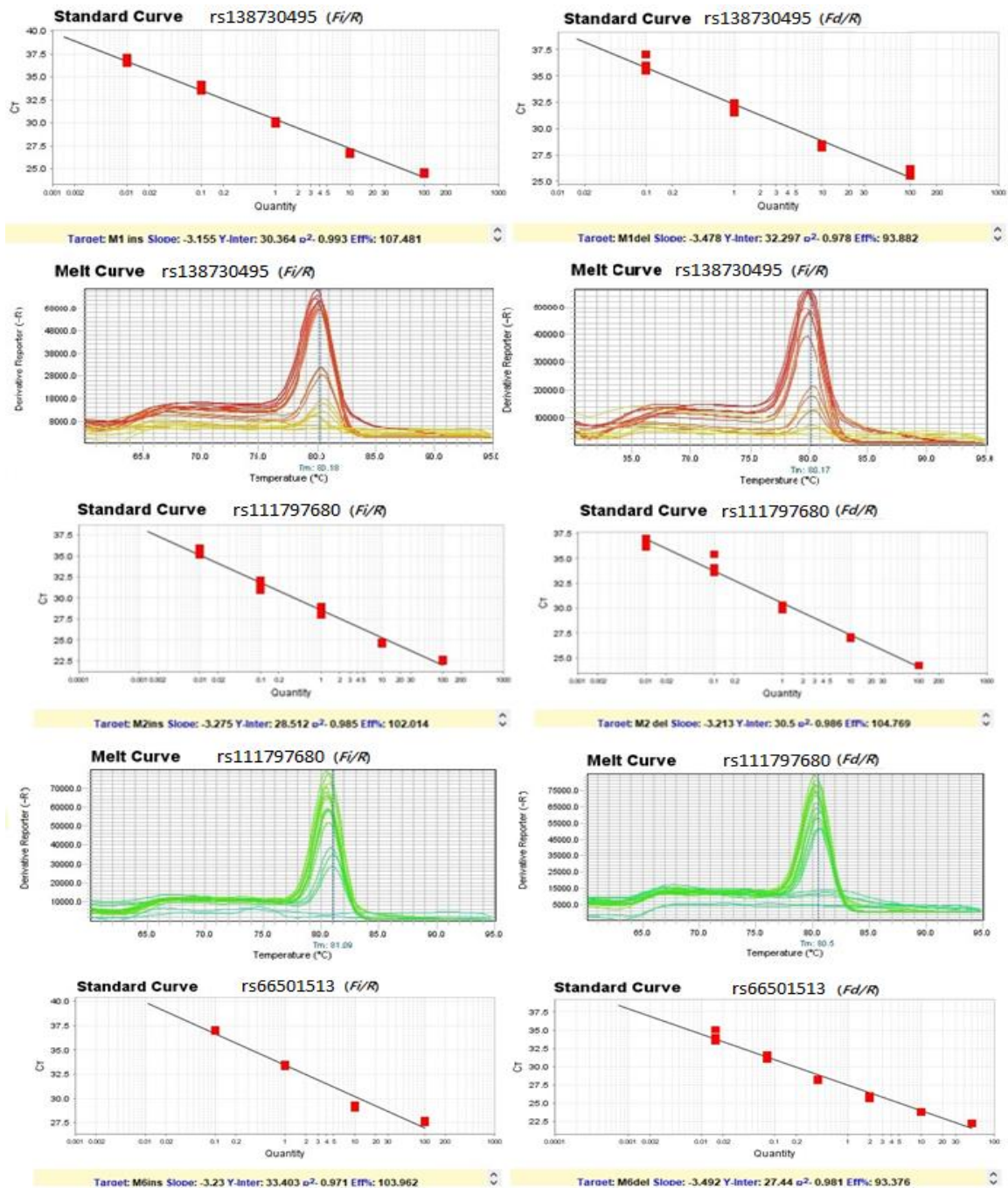
37	in/in	in/in	del/del	del/del	in/del	in/del	del/del	in/in
38	in/del	in/del	del/del	in/in	in/del	in/in	del/del	in/del
39	in/in	in/in	del/del	in/in	in/del	in/in	del/del	in/in
40	in/in	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del
41	in/in	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in
42	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del
44	in/in	in/in	in/del	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del
45	del/del	in/in	del/del	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del
46	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del
47	in/in	del/del	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	in/in
48	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	in/del	in/in	in/in
49	in/in	in/in	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/del
50	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	in/in
51	in/del	del/del	in/del	in/del	del/del	in/in	del/del	in/in
52	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	del/del	in/in	del/del
53	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del
54	in/del	del/del	in/in	in/del	in/del	del/del	in/del	in/in
55	in/in	in/in	in/del	in/del	del/del	in/in	in/del	del/del
56	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del
57	in/del	in/in	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
58	in/del	del/del	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	del/del
60	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del
61	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in
62	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	del/del
63	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del
64	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in
65	in/del	in/in	del/del	in/del	in/in	in/del	in/del	del/del
66	del/del	in/in	in/in	in/del	del/del	del/del	in/del	in/del
68	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	del/del	in/in
69	del/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del
70	in/in	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del
71	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/in	del/del	in/del
72	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
73	in/in	del/del	in/in	in/del	in/in	in/del	in/in	in/del
74	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
75	in/in	del/del	del/del	in/in	in/del	in/in	del/del	in/in
76	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	del/del	del/del	in/del
77	in/del	in/del	in/in	del/del	in/in	in/in	del/del	del/del
79	in/in	del/del	in/del	in/del	in/in	del/del	in/del	in/del
80	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del

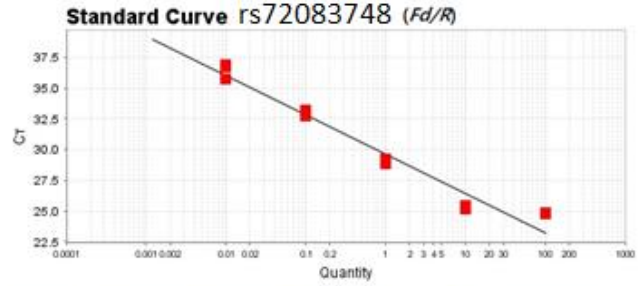
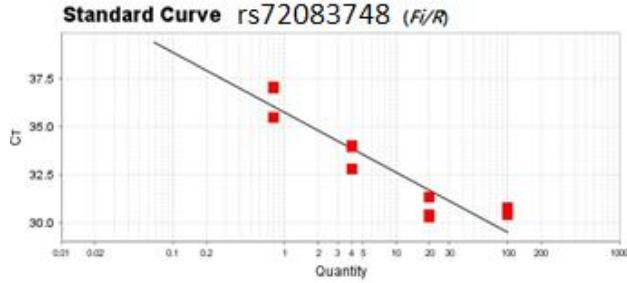
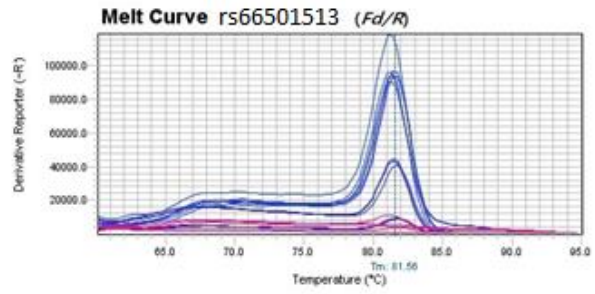
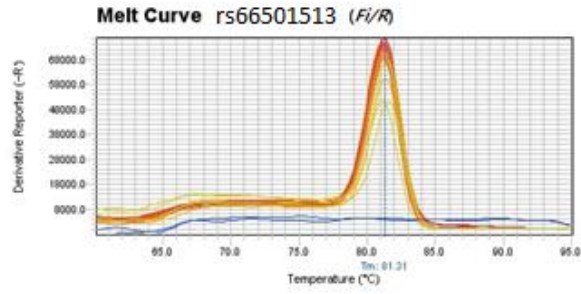
81	in/del	in/in	in/in	in/del	in/in	in/in	del/del	in/in
82	in/in	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del
83	in/del	del/del	in/del	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del
84	in/in	in/del	del/del	del/del	del/del	in/del	in/in	del/del
85	in/in	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del
86	del/del	in/in	in/in	del/del	in/in	in/in	del/del	in/del
87	in/del	del/del	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	del/del
88	in/in	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del
90	in/in	in/del	in/in	del/del	del/del	in/in	del/del	in/in
91	in/in	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/in
92	in/in	del/del	del/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del
93	in/del	in/del	in/del	in/in	del/del	in/in	in/in	in/in
94	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del	in/in	in/in	in/del
95	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del
96	in/del	del/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in
99	in/in	in/in	in/del	del/del	in/in	in/del	in/del	del/del
100	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	del/del	in/del	in/in
101	in/in	in/del	in/in	na	in/del	in/in	del/del	in/in
102	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
103	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del
104	in/in	in/del	del/del	in/del	del/del	in/in	in/del	del/del
105	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	del/del
106	in/in	in/del	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in
107	in/in	in/in	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del
108	in/del	in/del	in/in	in/del f	del/del	in/del	in/del	in/del
109	in/del	in/del	in/in	del/del	del/del	in/in	na	in/del
112	in/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in
113	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/in	del/del	in/in
114	in/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/in	del/del	in/in
115	in/del	del/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in
116	in/in	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in
118	del/del	in/in	in/in	in/del	in/in	del/del	in/del	in/in
119	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	in/del	in/del	in/in
120	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/in
121	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/in
122	del/del	in/del	in/del	in/del	in/in	del/del	del/del	in/del
124	in/del	in/in	del/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del
126	in/in	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in
128	in/del	del/del	del/del	in/del	del/del	in/in	del/del	in/in
129	in/in	in/in	in/in	in/del	in/in	in/in	del/del	del/del

130	in/in	del/del	in/in	na	del/del	in/in	del/del	in/in
131	in/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/in	in/del
132	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	del/del	in/in
134	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del	in/in	in/in
135	in/in	in/del	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in
136	in/in	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in
137	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del	in/in	in/in	del/del
138	in/in	del/del	in/del	in/in	in/in	del/del	del/del	in/in
139	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del
140	in/del	del/del	in/del	in/in	in/del	in/in	del/del	in/in
141	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/del
142	in/in	del/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del
143	in/in	del/del	in/in	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del
144	in/in	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	in/del	in/del
145	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in
146	in/in	del/del	in/in	in/del	del/del	in/in	in/del	in/del
147	na	in/del	in/in	na	in/del	in/in	in/del	in/del
148	in/in	in/in	in/del	in/in	in/del	in/in	in/del	del/del
149	in/del	in/in	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del
152	in/del	in/in	del/del	in/del	del/del	in/del	del/del	in/del
153	in/in	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del
155	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del
156	in/in	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del
157	in/in	in/in	in/del	del/del	in/del	in/del	in/del	in/del
159	in/in	del/del	in/del	in/del	del/del	in/in	in/del	in/in
161	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/in
162	in/del	in/del	in/in	del/del	del/del	in/del	in/del	in/del
163	in/in	del/del	del/del	in/in	in/del	del/del	del/del	del/del
164	na	na	in/in	na	in/del	na	na	in/del
165	in/in	in/del	in/del	na	del/del	in/del	del/del	in/del
166	in/in	in/del	in/in	del/del	in/in	del/del	del/del	in/in
167	in/in	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	del/del	in/in
168	in/in	del/del	in/in	in/del	in/del	in/del	in/del	in/del
169	in/del	del/del	in/in	del/del	in/del	in/del	del/del	in/in
170	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	del/del
171	in/in	in/del	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	in/in
173	in/in	in/in	in/in	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del
174	in/del	in/in	del/del	in/del	in/in	in/in	del/del	in/del
175	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	del/del	del/del	in/del
176	in/in	in/in	del/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del

177	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	del/del	in/del
178	in/in	del/del	na	in/del	in/del	na	in/del	in/del
180	in/in	in/del	in/del	in/in	in/in	in/in	in/del	in/del
181	in/in	in/del	in/in	in/in	in/del	in/del	in/del	in/in
182	in/del	in/del	in/in	na	del/del	in/del	del/del	in/del
183	in/in	del/del	na	in/in	in/in	del/del	in/del	del/del
184	in/del	del/del	na	in/del	in/del	in/in	del/del	in/del
185	in/in	in/del	in/del	in/in	in/del	in/del	in/in	in/in
186	in/del	in/del	in/del	in/del	del/del	in/del	in/del	in/in
187	del/del	del/del	del/del	del/del	in/del	in/in	in/del	in/del
188	in/in	in/del	na	na	in/in	del/del	del/del	in/del
189	in/del	in/del	in/in	in/in	in/in	in/in	del/del	in/del
190	in/del	in/del	in/del	in/in	in/del	in/in	del/del	in/in

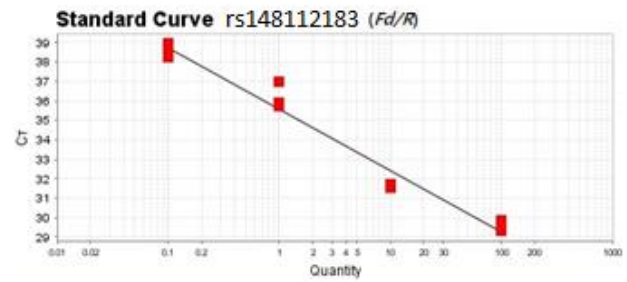
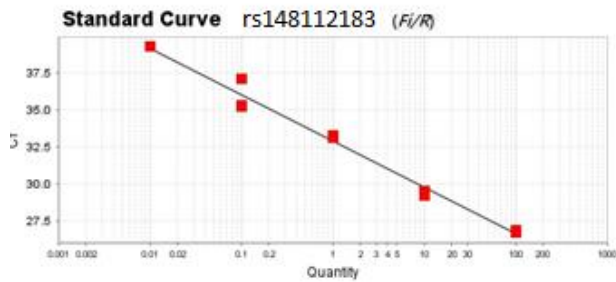
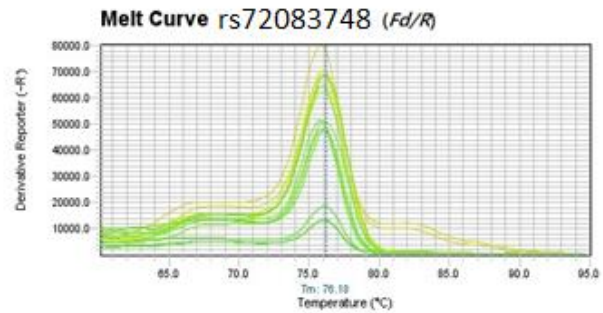
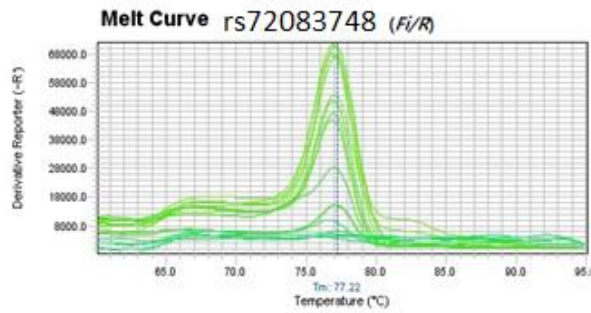
APÊNDICE B. Padronização dos lócus InDels na qPCR. Curva de eficiência dos primers inserção-específico/flanqueador e deleção-específico/flanqueador dos lócus rs138730495, rs111797680, rs66501513, rs72083748, rs148112183, rs67519581, rs151001596 e rs1610941. As letras F e R referem-se aos primers Forward e Reverse, respectivamente. A letra i refere-se aos primers dirigidos à sequência inserção e a letra d a primers deleção-específicos. Os parâmetros slope e R2 correspondem, respectivamente, à declividade da reta e ao coeficiente de correlação linear.





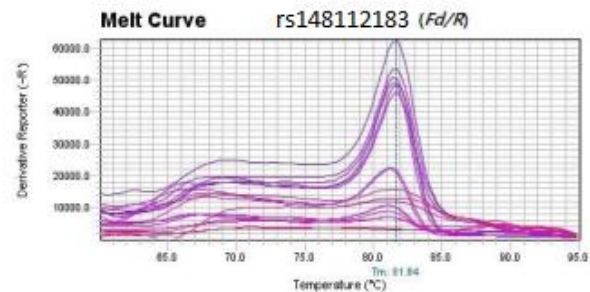
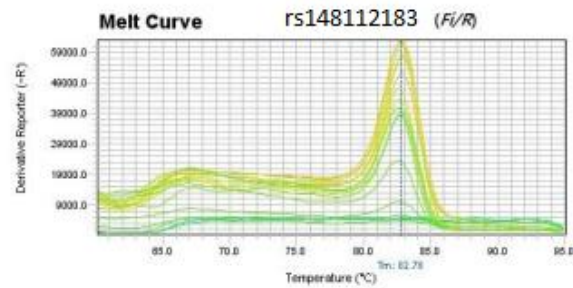
Target: M17 ins Slope: -3.126 Y-Inter: 35.719  $\rho^2$ : 0.861 Eff%: 108.875

Target: M17del Slope: -3.209 Y-Inter: 29.602  $\rho^2$ : 0.958 Eff%: 104.938

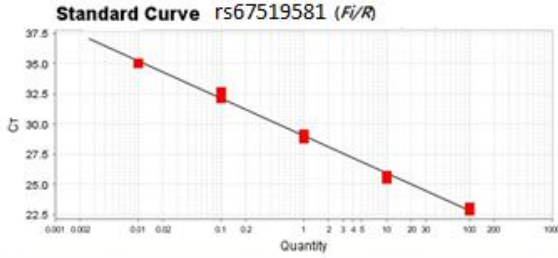


Target: L19ins Slope: -3.121 Y-Inter: 32.866  $\rho^2$ : 0.984 Eff%: 109.117

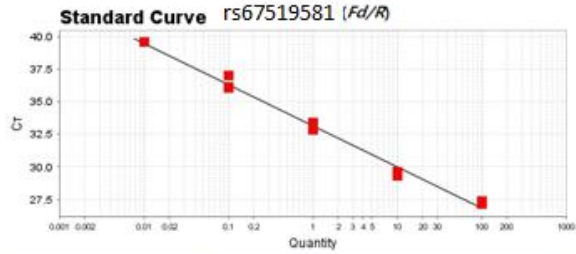
Target: L19del Slope: -3.168 Y-Inter: 35.581  $\rho^2$ : 0.969 Eff%: 106.86



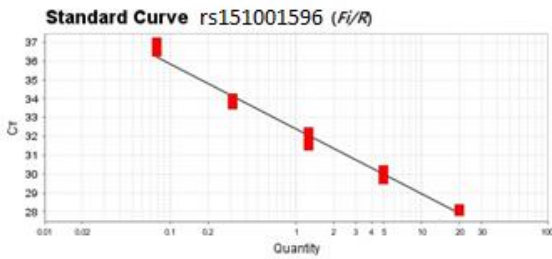
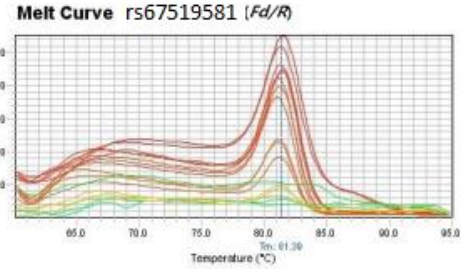
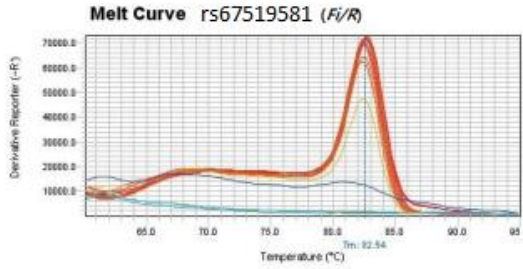




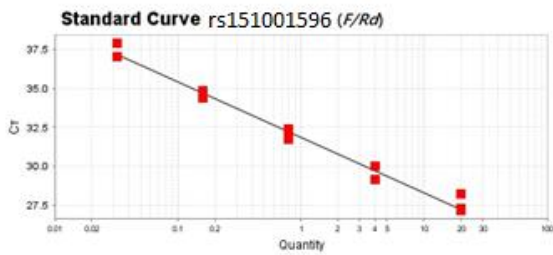
Target: L22ins Slope: -3.108 Y-Inter: 29.028  $\rho^2$ : 0.995 Eff%: 109.788



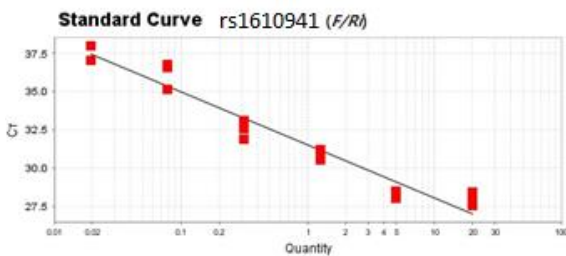
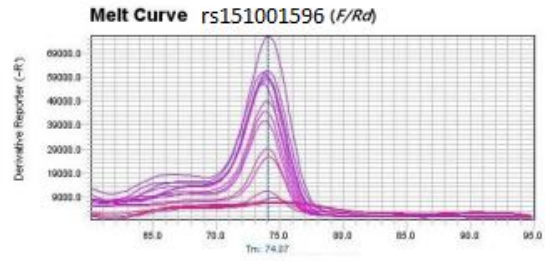
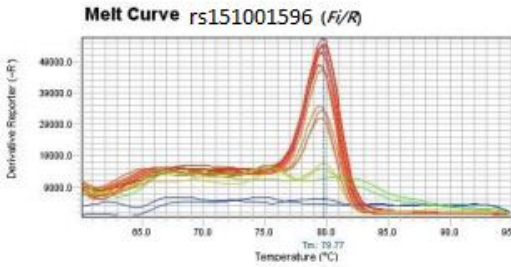
Target: L22del Slope: -3.152 Y-Inter: 33.114  $\rho^2$ : 0.989 Eff%: 107.63



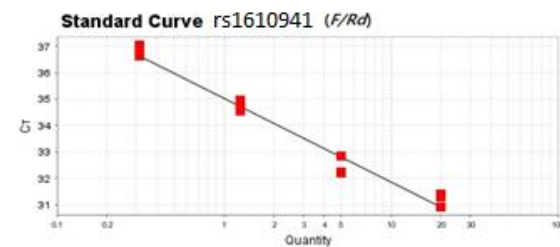
Target: MID1039 ins Slope: -3.46 Y-Inter: 32.397  $\rho^2$ : 0.986 Eff%: 94.548



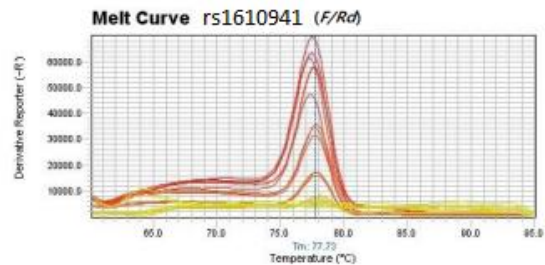
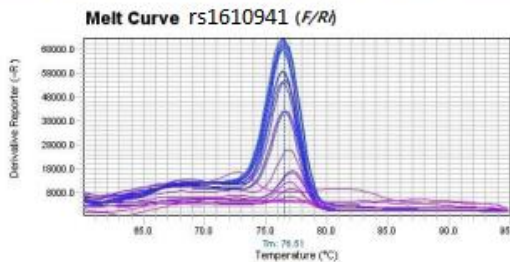
Target: MID1039del Slope: -3.55 Y-Inter: 31.85  $\rho^2$ : 0.982 Eff%: 91.275



Target: MID856ins Slope: -3.465 Y-Inter: 31.51  $\rho^2$ : 0.94 Eff%: 94.365



Target: Mid856del Slope: -3.173 Y-Inter: 35.047  $\rho^2$ : 0.975 Eff%: 106.623



## Apêndice C. Protocolo de Extração de DNA (adaptado de Higushi 1989)

### Reagentes e soluções

1. Tampão de lise de eritrócitos (Lise I): Tris/HCl 0,01 M pH 7,6; Sacarose 0,32 M; MgCl<sub>2</sub> 5,0 mM; Triton X-100 1%.
2. Tampão de lise de leucócitos (Lise II): Tris/HCl 0,01 M pH 8,5; KCl 0,05 M; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; NP-40 (Detergente Nonidet) 1%; Tween 20 – 1%.
3. Proteinase K (SIGMA-ALDRICH): 10 mg/mL.

### Procedimento

- Pipetar 50 µL de sangue total em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL.
- Acrescentar 1,0 mL de tampão de lise de I e homogeneizar.
- Centrifugar a 6.000 rpm por 2 minutos.
- Descartar o sobrenadante e acrescentar, novamente, 1,0 mL de tampão de lise I ao precipitado.
- Repetir esse procedimento até que o precipitado apresente cor clara (3-4 repetições), indicando a ausência de contaminação por hemoglobina.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em uma solução com 300 µL de tampão de lise II e 5 µL de proteinase K.
- Armazenar as amostras em estufa a 65°C por no mínimo 1 hora.
- Aquecer as amostras a 94°C por 10 minutos para inativação da proteinase K.

Apêndice D. Extração de DNA de plasma: Kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA)

#### Procedimento

Preparar o Buffer AW1, AW2 e Protease de acordo com as recomendações do fabricante.

- Descongelar as amostras a 37°C por 10 minutos e homogeneizá-las.
- Aquecer o banho-maria a 56 °C.
- Aliquotar 500 µL do plasma em um tubo de 1,5ml.
- Centrifugar por 10 min a 14000rpm, para remoção de células residuais.
- Pipetar 40 µL de protease em um tubo separado de 1,5ml.
- Pipetar 400 µL do sobrenadante do plasma centrifugado no tubo contendo protease.
- Adicionar 400 µL do buffer AL nos tubos.
- Homogeneizar levemente os tubos e misturar no vórtex por 15 segundos.
- Incubar as amostras em banho-maria a 56 oC por 10 minutos.
- Centrifugar (spin) nos tubos (8000rpm) para remoção das gotas residuais da tampa.
- Adicionar 400 µL de etanol 100%.
- Vórtex por 15 segundos.
- Centrifugar (spin) nos tubos (8000rpm).
- Aplicar 650 µL da mistura na coluna Qiagen, sem molhar a borda ou tocar na membrana.
- Centrifugar por 2 minutos a 8000rpm.
- Retirar a coluna e colocar em novo tubo.
- Aplicar o restante da mistura (650 µL) na coluna Qiagen, sem molhar a borda ou tocar na membrana.

- Centrifugar novamente por 2 minutos a 8000rpm.
- Retirar a coluna e colocar em novo tubo.
- Adicionar à coluna 500  $\mu$ L do buffer AW1.
- Centrifugar por 1 min a 8000rpm.
- Colocar a coluna em novo tubo.
- Adicionar à coluna 500  $\mu$ L do buffer AW2.
- Centrifugar a 13000rpm por 4 min.
- Colocar a coluna em novo tubo de 1,5 mL com tampa.
- Pipetar 50  $\mu$ L do buffer AE na coluna, fechar a tampa e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar a 8000rpm por 3 minutos.
- Retirar a coluna, que pode ser descartada.

O DNA extraído pode ser estocado a 4°C no máximo por 2 semanas ou a -20°C por tempo indefinido.

## Apêndice E. Protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase

### Reagentes e soluções

1. Tampão de reação 10X livre de  $MgCl_2$ : 100 mM Tris/HCl pH 8,3; 500 mM KCl; (SIGMA-ALDRICH).
2.  $MgCl_2$ : 25mM (SIGMA-ALDRICH).
2. Primers InDel: cada primer em solução trabalho individualizada de 2,5  $\mu$ M (SIGMA-ALDRICH).
3. Desoxiribonucleotídeos trifosfato – dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP): 20 mM (BIOTOOLS-B&M Labs, SA).
4. Taq DNA polimerase: 5 U/ $\mu$ L (SIGMA-ALDRICH).
5. Água destilada ultrapura (MilliQ - Millipore Corporation).

### Procedimento

As reações de PCR convencional são realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L. Para o preparo do Mix de Reagentes, misturar em um microtubo de 1,5mL:

- 2,5  $\mu$ L de tampão de reação;
- 2,0  $\mu$ L de  $MgCl_2$ ;
- 0,25  $\mu$ L dNTP;
- 2  $\mu$ L de cada primer (Forward e Reverse);
- 0,1  $\mu$ L de Taq.
- Acrescentar água destilada ultrapura no mix de reagentes completando o volume final de 21  $\mu$ L.

A quantidade de *primer* utilizada no mix de reagentes pode variar conforme o locus analisado e estão especificadas na **Tabela 2**. *Em microtubos de 0,5 mL:*

- Pipetar 4  $\mu$ L de DNA genômico de cada amostra

- Pipetar 4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura em um microtubo como controle negativo de amplificação;
- Acrescentar em cada microtubo os 21  $\mu\text{L}$  do mix de reagentes.

## Apêndice F. Protocolo de Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

### Reagentes e soluções

1. Solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1): 29 g de acrilamida (PM = 71,08); 1 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida (PM = 154,17); 100 mL de água destilada.
2. Tampão TBE 10X 0,9 M pH 8,0: 108 g de Tris (PM = 121,1); 53 g de ácido bórico (PM = 61,83); 40 mL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0.
3. Tampão TBE 1X 0,9 M pH 8,0: 100 mL de Tampão TBE 10X; 900 mL de água destilada.
4. TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) (SIGMA-ALDRICH).
5. Solução saturada de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio (PM = 270,32); 6,5 mL de água destilada.
6. Tampão de amostra Loading Buffer: Sacarose; Bromofenol 2,5%; Xilenocianol 2,5%; EDTA 0,5 M pH 8,0; TBE 10X; Ficol 30%.
7. Mix para gel não-desnaturante 10%: 6,66 mL de solução acrilamida/bisacrilamida; 1,4 mL de glicerol; 9,7 mL de água destilada; 2,0 mL de TBE 10%.
8. Ladder 100 pb: 5  $\mu$ L de solução ladder 500  $\mu$ g/ $\mu$ L; 150  $\mu$ L de água destilada; 50  $\mu$ L de Loading Buffer.

### Procedimento

#### Montagem do cassete de vidro:

- Colocar entre duas placas de vidro (17 cm x 13 cm) dois espaçadores de teflon em cada borda lateral;
- Prender o conjunto com grampos nas bordas laterais;
- Preparação do gel:
- Em um béquer pequeno misturar 13 mL do mix para gel, 500  $\mu$ L de persulfato de potássio e 20  $\mu$ L de TEMED (catalisadores da polimerização);

- Imediatamente após o preparo, verter cuidadosamente a mistura no cassete de vidro montado;
- Encaixar um pente de teflon na extremidade superior do cassete com o gel ainda não polimerizado para que sejam formados os poços, onde serão aplicadas as amostras do DNA amplificado.
- Aguardar aproximadamente 30 minutos para polimerização do gel.
- Remover o pente e os grampos cuidadosamente, sem desmontar o cassete e lavar os poços formados com água corrente.
- Remover a água acumulada nos poços vertendo-se repetidamente o cassete com os poços para baixo.

#### Eletroforese:

- Posicionar o cassete com o gel na cuba de eletroforese vertical, prendendo-o com grampos nas laterais.
- Adicionar o tampão de corrida (TBE 1X) em ambos os polos (superior e inferior), de maneira que os poços fiquem preenchidos com o tampão;
- Conectar a cuba a uma fonte de voltagem constante.
- Realizar uma corrida inicial, antes da aplicação das amostras, para checagem do correto funcionamento do aparato.
- Deligar a fonte e aplicar com uma seringa de vidro um mix de 6  $\mu$ L da amostra amplificada por PCR e 6  $\mu$ L de Loading Buffer.
- Pipetar em um dos poços da placa um mix de 6 $\mu$ L do marcador de peso molecular (100 pb) e 6  $\mu$ L de Loading Buffer.
- Após aplicação das amostras, iniciar a eletroforese ligando a fonte na voltagem padronizada.
- A duração da corrida eletroforética é baseada no tamanho das bandas e sua posição desejada no gel.



## Apêndice G. Protocolo de coloração e secagem de gel

### Reagentes e soluções

1. Solução fixadora (volume 1L): 160 mL de álcool etílico; 7 mL de ácido acético glacial e 833mL de água destilada.
2. Solução reveladora (volume 1L): 22,5 g de NaOH (PM= 40,00); 1 L de água destilada. No momento da coloração, adicionar 2 mL de formaldeído (PM = 30,05) para cada 100 mL de solução reveladora utilizada.
3. Solução de nitrato de prata (volume 1L): 100 g de nitrato de prata; 1L de água (armazenar a solução sob abrigo da luz).

### Procedimento:

- Retirar os espaçadores do cassete e separar as placas de vidro com o auxílio de uma espátula, removendo o gel da placa;
- Colocar o gel em recipiente contendo 100 mL de solução fixadora, acrescida de 3 mL da solução de nitrato de prata;
- Manter o gel em agitação nessa solução por aproximadamente 5 minutos para impregnação uniforme da prata;
- Descartar a solução anterior e adicionar ao recipiente 100 mL de água destilada aquecida a 60°C para lavagem do gel;
- Descartar a água e adicionar 100 mL da solução reveladora levemente aquecida;
- Acrescentar, de maneira uniforme, 3 mL de formaldeído à solução e agitar levemente o recipiente até a revelação completa das bandas.
- Descartar a solução reveladora e acrescentar 100 mL de solução fixadora para interromper a reação de revelação.

### Secagem do gel:

- Cobrir uma placa de vidro com uma folha de papel celofane molhada e posicionar o gel sobre ela.

- Cobrir a placa com outra folha de papel celofane molhada, de maneira que não forme bolhas de ar entre as duas camadas.

A secagem ocorre à temperatura ambiente durante 1 ou 2 dias, dependendo das condições ambientais.

## Apêndice H. Protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

### Reagentes e soluções

1. qPCRBio SyGreen Mix® (PCR Biosystems)
2. Passive Reference ROX Additive 50  $\mu$ M. (PCR Biosystems)
3. Primers *Forward* e *Reverse*: cada *primer* em solução individualizada de 2,5  $\mu$ M (SIGMA-ALDRICH).
4. Água destilada ultrapura MilliQ (Millipore Corporation).

### Procedimento

Nas reações de PCR em Tempo Real, realizadas em um volume final de 20  $\mu$ L, são utilizados 2  $\mu$ L de DNA genômico e 18  $\mu$ L do mix de reagentes. Durante o preparo do mix de reagentes todas as soluções devem ser conservadas em gelo.

#### Mix de reagentes:

- Misturar em um microtubo de 1,5ml: 10  $\mu$ L de SyGreen Mix, 0,196  $\mu$ L de ROX Additive 50  $\mu$ M. e 1  $\mu$ L de cada primer (*Forward* e *Reverse*).

\*As quantidades de primers podem variar conforme o locus analisado e estão descritas na **Tabela 3**.

- Acrescentar água destilada ultrapura completando o volume de 18  $\mu$ L e homogeneizar a solução.

Pipetar em cada microtubo de 0,2 mL da placa de 96 poços:

- 2  $\mu$ L de DNA genômico de cada amostra
- 18  $\mu$ L do mix de reagentes. Homogeneizar.

Vedar a placa com filme adesivo.

## ANEXOS

Anexo I. Aprovação pelo Dep. Ginecologia e Obstetrícia FMRP.



**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP**  
**DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

Av. Bandeirantes, 3900 - 8º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900  
Fone (016) 3602-2583 - Fax (016) 3602-1524

Ribeirão Preto, 18 de abril de 2018.

Ilmo Sr. Prof. Dr.  
Aguinaldo Luiz Simões

Prezado Professor,

O projeto intitulado "**Marcadores inserção/deleção na quantificação de DNA fetal livre em gestantes**", protocolado sob nº 99/2018, de sua autoria foi analisado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e o parecer do setor é favorável ao desenvolvimento do mesmo.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis**  
Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de  
Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP



## Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto

Estado de São Paulo - Secretaria Municipal da Saúde



**OF. 0217/19- CAPP**

**CSV/2019**

Ribeirão Preto, 23 de Janeiro de 2019.

Senhor Orientador,

Informamos que os gerentes das Unidades : UBS CAMPOS ELISEOS, UBS VILA ABRANCHES, UBS JARDIM AEROPORTO, UBS DOM MIELE, UBS PARQUE RIBEIRÃO PRETO e a Coordenadora do Programa atenção Saúde da Mulher da Secretaria Municipal da Saúde manifestaram a concordância com a realização do projeto de pesquisa em suas Unidades.

Sendo assim, declaro estar ciente e concordo com a realização do projeto de pesquisa: "**MARCADORES INSERÇÃO/DELEÇÃO NA QUANTIFICAÇÃO DE DNA FETAL LIVRE EM GESTANTES**" sob a responsabilidade da Prof. Dr. **AGUINALDO LUIZ SIMÕES** e da pesquisadora **ALINE SILVA PAULA BRAZOROTTO** e outros.

Informo que a pesquisa somente poderá iniciar quando obtiver a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição proponente, devendo o pesquisador apresentar-se com antecedência ao serviço para combinar melhor data para início do projeto de pesquisa.

Fica consignada a liberdade desta Secretaria em retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem que isso lhe traga prejuízo ou responsabilização de qualquer ordem. Solicito que a pesquisadora encaminhe à Secretaria Municipal da Saúde o Relatório Final ao encerrar a pesquisa.

Cordialmente,

**Dra. Claudia Siqueira Vassimon**

**Coordenadora da Comissão de Avaliação de Projeto de Pesquisa  
da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto**

Anexo III. Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Nome da pesquisa: Marcadores Inserção/Deleção na quantificação de DNA fetal livre em gestantes

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões (CRM 31897)

Endereço para contato: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14040-901, Ribeirão Preto –SP-

Departamento de Genética - FMRP-USP

Telefone: (16) 3315-3050

e-mail: [alsimoes@fmrp.usp.br](mailto:alsimoes@fmrp.usp.br)

Prezada doadora,

Este projeto de pesquisa busca verificar o quanto de DNA do feto passa para a circulação da mãe ao longo da gestação. Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletadas uma amostra de *swab* bucal, uma única vez, e cerca de 10 mL de seu sangue (aproximadamente uma colher de sopa), de duas a três vezes ao longo da gestação, com coletas intervaladas em cerca de oito semanas, de acordo com o seu retorno ao atendimento no posto de saúde.

A coleta será feita por um profissional habilitado e capacitado nessa atividade e feita com material descartável.

A realização desta pesquisa não implicará em procedimentos que possam comprometer sua saúde. Em todo o procedimento não há riscos além de um pequeno desconforto causado pela “picada” da agulha em seu braço, durante a coleta de sangue.

A qualquer momento você pode pedir esclarecimentos sobre qualquer aspecto deste trabalho (procedimentos, benefícios, e/ou riscos).

Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso lhe traga qualquer prejuízo no atendimento.

Você terá garantida a segurança de que não será identificada e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas.

Seu material biológico será armazenado durante a pesquisa, sob responsabilidade do pesquisador responsável, compondo Biorrepositório devidamente registrado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição.

Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas.

O investigador principal, Dr. Aguinaldo Luiz Simões, pode ser encontrado no Bloco B do Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP. Tel : (16)3315-3050 ou no Setor de Genética Médica do HC (16)3602-2598.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228. E-mail: [cep@hcrp.fmrp.usp.br](mailto:cep@hcrp.fmrp.usp.br).

---

Assinatura do pesquisador responsável

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, residente na \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_, cidade de \_\_\_\_\_, telefone \_\_\_\_\_ abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo em participar da pesquisa por livre e espontânea vontade.

Declaro ainda que recebi uma cópia deste termo de consentimento assinada pelo pesquisador responsável.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do doador

## **Insertion/Deletion markers in the quantification of circulating fetal DNA in pregnant women**

Keywords: cffDNA; InDel; real-time PCR; insertion-specific primer; deletion-specific primer.

### **Summary**

**Introduction:** Cell-free fetal DNA in maternal circulation (cffDNA) is a source of fetal genetic material for non-invasive prenatal diagnosis and its quantification can be useful in screening for fetal aneuploidies or investigating gestational complications.

**Objective:** The objective of this work was to quantify cffDNA in the plasma of pregnant women and establish the evolution of the relative amount of cffDNA according to gestational age, using allele-specific InDels markers by Real-Time PCR (qPCR).

**Material and Methods:** Quantification of cffDNA was performed with a set of insertion and specific-deletion/flanking primers, in pregnant women informative in each marker, and total plasma DNA, using primers directed to sequences of the  $\beta$ -globin gene. The cffDNA quantifications were compared with those obtained with specific Y marker (SRY). The pregnant women's ancestry profile was inferred by analyzing a panel of 12 AIMs (ancestry informative markers - AIMs) and the relationship between ancestry and maternal BMI with the fetal fraction was evaluated using a linear regression.

**Results:** Our panel of InDels was informative in 64% of the sample. The fetal fraction was estimated at 10.0%, 14.3% and 18.9%, in successive gestational trimesters. Quantifications with InDels markers showed agreement and strong correlation ( $\rho=0.77$ ,  $p<0.001$ ) with those obtained with SRY. Gestational age was associated with an increase in fetal fraction ( $p=0.0018$  [95% CI, 0.017–0.077]) and there was no evidence of association between BMI or maternal ancestry with the relative amount of fetal DNA circulating in our country sample.

**Conclusion:** The use of InDels primers directed to exclusive fetal sequences enabled the accurate quantification of cffDNA throughout pregnancy and the described methodology can be applied in any context in which the measurement of residual DNA is necessary.

### **Introduction**



The detection of cell-free fetal DNA (cffDNA) in the plasma and serum of pregnant women has generated new perspectives for non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) (LO et al., 1997). Although the fetal genome is completely represented in the maternal circulation (LO et al., 2010), it is in the form of DNA fragments smaller than 313 base pairs (KIMURA et al., 2011). Therefore, it is a great challenge to distinguish and quantify fetal genetic material among the massive amount of free maternal DNA. For this purpose, different procedures and molecular markers have been used, such as genotyping of SNPs using different sequencing techniques, identification of epigenetically marked sequences, quantification by real-time PCR of markers linked to the Y chromosome. sequences present only in the fetal genome, such as Y chromosome sequences avoid competition between the same regions of the maternal and fetal genome for primers. However, the use of these specific Y sequences restricts the analysis to pregnancies with a male fetus. Following the idea of amplifying exclusively fetal sequences, we demonstrated in our research group the possibility of identifying circulating fetal DNA with Insertion/Deletion markers (InDels), using allele-specific primers for this purpose (NG, 2015; RODRIGUES, 2018; SANTOS, 2014a).

For genotyping of InDels polymorphisms, initially, pairs of primers complementary to the flanking regions (Forward/Reverse) are used. These allow the identification of the three possible phenotypes for a bi-allelic InDel locus: *in/in*, *in/del* and *del/del*. The insertion-specific primer together with the corresponding flanker (Forward-i/Reverse or Forward/Reverse-i) makes it possible to detect only the insertion, when present (Figure 1a). For amplification of cffDNA, we used insertion-specific/flanking primers in situations where the mother is homozygous *del/del* and the fetus heterozygous *in/del*.

In addition to the primers complementary to the insertion, primers targeting the deletion allele were also described in our research group (RODRIGUES, 2018). Analogously to the primer specific for the insertion allele, the primer targeting the deletion pairs in the region immediately before the point at which the insertion sequence occurs, and this pairing ends after this insertion point (Figure 1b). Therefore, when used in conjunction with a second flanking primer, it allows amplification only in the absence of insertion. The use of primers complementary to fetal-specific deletion sequences, together with a second flanking primer, makes it possible to detect fetal alleles in situations where the mother is homozygous *in/in* and the fetus is potentially *in/del*.

CffDNA levels throughout pregnancy are influenced by biological factors, such as gestational age and maternal characteristics. Differences in cffDNA and total maternal free DNA dosages have also been reported between women with different ancestry profiles (GEROVASSILI et al., 2006; POON et al., 2013). In populations such as Brazil, it is necessary to analyze a set of ancestry informative markers (AIMs, which are genetic

polymorphisms that exhibit allelic frequency differentials greater than 30% between two parental populations and, therefore, allow the inference of ancestry in mixed populations (BONILLA et al., 2004; SILVA et al., 2010).

Therefore, the objective of the present work was to quantify the fetal DNA circulating in the plasma of pregnant women, using InDels markers by qPCR, to establish the evolution of the relative amount of cffDNA throughout pregnancy and verify the influence of maternal characteristics on these concentrations.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

Buccal swab and peripheral blood samples were collected from 164 pregnant women treated at the Health Units in the Municipality of Ribeirão Preto-SP-Brazil, during the prenatal routine. Pregnant women of any gestational age, with a single fetus, without a history of hypertension prior to pregnancy and/or other medical or obstetric complications were included in this cross-sectional study. This study was approved by the local ethics committee (Technical advice no: 2.911.390; CAAE: 95894918.7.0000.5440). The mothers' clinical data were obtained from consultation of electronic medical records.

### **Laboratory analysis**

#### **DNA extraction**

DNA from buccal swab samples was extracted according to the Protocol adapted from (HIGUCHI, 1989). These samples were used for phenotyping the mothers, in Conventional PCR reactions. Blood plasma DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit Extraction Kit. These samples were used for Real-Time PCR reactions.

#### **Insertion/Deletion Genetic Markers analyzed**

Ten insertion-specific or deletion-specific primers from six bi-allelic InDels marker loci were used in this study (Supplementary Material - Table 1). These markers were selected from the dbSNP and NCBI Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), whose selection criteria were heterozygosity between 30% and 50%, minimum sequence size of 20bp insertion and locus that would enable the design of flanking and allele-specific primers.

#### **Polymerase Chain Reaction**

The DNA extracted from the mothers' buccal swabs was evaluated with the flanking InDels primers, by Conventional PCR, to select the informative mothers (del/del or in/in) at each InDel locus. The quantities of primers used in the reagent mix may vary depending on the marker analyzed and are specified in Supplementary Material - Table 2. DNA amplification

reactions took place in the GeneAmp thermocycler ® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The amplification conditions were as follows: initial heating at 94°C for 5 minutes followed by 31 cycles of 94°C for 45 seconds, 59°C for 1 minute and 72°C for 1 minute and finally extension at 72°C for 10 minutes. The results of the products amplified in the Conventional PCR were visualized after electrophoresis in a 10% non-denaturing polyacrylamide gel (PAGE). Electrophoresis lasted approximately two hours, with a constant voltage source, adjusted to 200 V and 400 mA.

### **Real-Time PCR Reactions**

#### Insertion/Deletion Markers

Real-time PCR reactions for quantification with indel locus used the Sygreen ®PCR Biosystems dye as a fluorophore. The reactions occurred with a final volume of 20µL, using in each reaction, 10 µL of qPCRBio SyGreen Mix® (PCR Biosystems), 0.196 µL of ROX Additive 50 µM (PCR Biosystems) and Forward and Revers primers (SIGMA-ALDRICH) at concentrations described in Supplementary Material - Table 3.

The reactions took place in the Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System thermocycler. The indel locus amplification conditions followed the manufacturer's recommendations and consisted of: initial heating at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 5 seconds and extension for 25 seconds. The appropriate pairing/extension temperature for each locus is found in Supplementary Material - Table 3. The dissociation curve was produced at the end of all amplification reactions by increasing the temperature to 95°C for 15 seconds. The Real Time PCR assays had their results visualized in the StepOne Software version 2.3 (Applied Biosystems).

#### **β-globin and SRY quantification**

Amplification reactions with primers for β-globin and SRY gene sequences were carried out using the TaqMan system, according to the conditions described by LO et al., (1998). The SRY TaqMan system consisted of the amplification primers SRY-109F, 5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3'; SRY-245R, 5' -CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3'; and a dual-labeled fluorescent TaqMan probe SRY-142T, 5' -(FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA(TAMRA)-3'. The β-globin TaqMan system consisted of the amplification primers b-globin-354F, 5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3'; b-globin-455R, 5' -CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3'; and a dual-labeled fluorescent TaqMan probe b-globin-402T, 5' -(FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG(TAMRA)-3'. In each reaction we used 300 nM of each primer and 100 nM of the corresponding TaqMan probe. The reactions took place with a final volume of 20µL, using 10uL of TaqMan™ Universal PCR

Master Mix (Applied Biosystems™), in the Applied Biosystems StepOne Plus™ Real Time PCR System thermocycler. The amplification conditions consisted of: initial heating at 50°C for 2 minutes, followed by a denaturation step for 10 minutes at 95°C, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The results of the tests were visualized in the StepOne Software version 2.3 (Applied Biosystems™).

### **Quantification of Circulating Fetal DNA and Total DNA in the Plasma of Pregnant Women**

The qPCR reactions for cfDNA quantification were performed with DNA extracted from plasma of the informative pregnant women, that is, homozygous del/del or homozygous in/in mothers, with heterozygous in/del children, at each of the InDels locus analyzed.

The construction of the standard curve was carried out from serial dilutions of standard DNA from an individual heterozygous in/del for each marker, previously quantified by fluorimetry. The amounts of DNA used in the standard curve were 20ng; 5ng; 1.25ng; 0.312ng; 0.078ng and 0.019ng. 7µl of DNA extracted from plasma was used in each reaction for quantification of fetal DNA with indel markers and the SRY marker and 5µl of DNA for quantification of total circulating DNA, with β-globin primers.

The DNA concentration, expressed in ng/mL, was calculated using the following equation:

$$C = Q \times \frac{V_{DNA}}{V_{PCR}} \times \frac{1000}{V_{ext}}$$

Where: C= DNA concentration in plasma (ng/mL); Q= Quantity (ng) determined in the qPCR reaction; V<sub>DNA</sub>= Elution volume of DNA obtained after extraction (50µL); V<sub>PCR</sub>= Volume of DNA used in the qPCR reaction (7µL or 5µL); V<sub>ext</sub>= Volume of plasma used in DNA extraction (400µL). The definition of genomic equivalent (GE) was used to convert ng/mL into copies/mL: 1 GE/mL = 2 copies/ mL = 6.6 pg/ mL (Diploid genome).

### **Ancestry Analysis**

The pregnant women's DNA samples were evaluated with a panel of AIMs previously described in our research group (CAGNIN, 2015). This panel is composed of 12 AIMs previously described by SHRIVER et al. (1997) and LUIZON et al. (2009) capable of differentiating Europeans, Africans and/or Amerindians. Of these markers, five were genotyped by PCR-RFLP as SNPs (*CKM* rs4884:C>T, *DRD-2* rs1079598:C>T, *FY-Null* rs2814778:A>G, *LPL* rs285:C>T, *RB2300* rs2252544:C>T), seven were genotyped by conventional PCR, including insertions *Alu* (*Sb19.3* rs3138524, *APO* rs3138522, *PV92*

rs3138523) and InDels (*AT3-I/D* rs3138521, *MID-52* rs16344, *MID-93* rs16383, *MID-575* rs140864). Individual ancestry was estimated using the Structure Software v2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), adopting the tri-hybrid model of miscegenation, with  $K=3$ .

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed in R v. 4.3.1 (<http://www.r-project.org/>). Categorical variables were compared using Pearson's  $\chi^2$  Square test and the distribution of data expressed as medians were compared between groups using the Kruskal-Wallis non-parametric test and Dunn's post-hoc test, for results with  $p < 0,05$ . The correlation between the quantification obtained from cfDNA with InDels and SRY markers was evaluated by Spearman's correlation and agreement between the methods by Bland-Altman analysis. Simple and multiple linear regression analyses were performed with the fetal fraction as the dependent quantitative variable and gestational age, BMI and maternal ancestry (European, African and Amerindian) as independent quantitative variables. Normality of residuals was assessed using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity using the Breusch-Pagan test. To meet the assumption of normal distribution of the model's residuals, necessary for linear regression analysis, the Box-Cox transformation of the fetal fraction data was performed.

## **RESULTS**

### **Characteristics of the study population**

Table 1 presents the characteristics of the 164 pregnant women, with gestational ages between 4 weeks and 37 weeks +1 day, included in the study. The samples were divided into gestational trimesters, including mothers with gestational age up to 13 weeks and 6 days in the 1st Trimester, in the 2nd Trimester, pregnant women from 14 weeks to 27 weeks and 6 days and in the 3rd Trimester, pregnant women between 28 weeks and 41 weeks and 6 days.

The distribution of data expressed as medians were compared between groups using the Kruskal-Wallis non-parametric test and proportions, in the case of categorical variables (nulliparity) were compared using Pearson's  $\chi^2$  Square test. There was no statistical difference in maternal age ( $g1=2$ ,  $p=0.4207$ ), weight ( $g1=2$ ,  $p= 0.7953$ ), height ( $g1=2$ ,  $p=0.9883$ ), maternal BMI ( $df=2$ ,  $p=0.6631$ ) and nulliparity ( $\chi^2= 5.857$ ,  $df= 2$ ,  $p= 0.0534$ ) between gestational trimesters, considering  $\alpha=0.05$ .

### **Phenotypic determination**

After amplification by Conventional PCR with primers flanking the insertion (Forward and Reverse), it was possible to classify pregnant women into three possible phenotypes: a) homozygosity for the insertion allele (in/in); homozygosity for the deletion allele (del/del) and heterozygosity (in/del). Potentially informative pregnant women at each InDel locus were those homozygous (in/in) or (del/del), being tested in real-time PCR with deletion-specific/flanking or insertion-specific/flanking primers, respectively. The observed genotypic frequencies, frequency of the insertion allele ( $\pi$ ), the p value of the exact test for the Hardy-Weinberg Equilibrium (p-EHW) found for each InDel marker are described in Table 2.

### **Quantification of total circulating DNA**

The quantification of total DNA (maternal and fetal) circulating in the plasma of pregnant women carried out with primers for  $\beta$ -globin gene sequences showed an efficiency of 85.3% and 97.7%, and a linear correlation of 0.994 and 0.996. The concentrations obtained in each gestational trimester and data distribution is represented in the boxplot (Figure 2). There was no statistical difference in the concentration of total circulating DNA between the gestational trimesters (Kruskal-Wallis chi-square= 0.8061, df = 2, p = 0.668).

### **Quantification of fetal DNA with InDels markers**

Our panel of InDels was informative in 64% of samples. It was not possible to estimate the fetal fraction in 59 of the 164 samples collected, as they were not informative in any of the InDels loci used for quantification or because they were below the quantification limit of the qPCR reaction. The fetal fraction (%) was calculated as the ratio between the amount of circulating fetal DNA, estimated with InDels markers, and the amount of total DNA circulating in plasma, obtained with  $\beta$ -globin (Table 3). The Kruskal-Wallis test showed that there are differences in the fetal fraction between gestational trimesters ( $\chi^2_{(2)} = 7.444$ ,  $p < 0.05$ ). Dunn's post-hoc showed that the cffdna fraction in the 3rd gestational trimester (18.9 and 14.2, median and interquartile range) is different from that observed in the 1<sup>o</sup> gestational trimester (Figure 2;  $p_{\text{ajus}} = 0.0196$ ).

### **Quantification with SRY and comparison with Indels markers**

Of the 164 samples collected, 55 were pregnant women with a male fetus, 74 with a female fetus and 35 there were no records of the fetal sex in the medical records. All samples were tested with primers for the SRY gene sequence. There was no amplification of samples from pregnant women with a female fetus. There was amplification in 40 of the 55 samples from pregnant women with a male fetus. The efficiency of the reaction with SRY was 79.5% and  $R^2 = 0.916$ . Quantifications obtained with SRY were compared with those of indel markers. Spearman's correlation showed that there is a positive and strong correlation ( $\rho = 0.77$ ,  $p < 0.001$ ) between the quantifications (Figure 3). The Bland-Altman graph shows the agreement between the two markers (Figure 3).

### **Ancestry Analysis**

The individual ancestry of each of the 164 pregnant women was estimated and the ancestry proportions of each one, represented by a bar, can be seen in Figure 4. Populations representing African (AFR), European (EUR) and Amerindian (AME) ancestries comprised three clusters (Figure 4A), with the majority of individuals allocated at each end of the triangle. The study population, a Brazilian sample of pregnant women from the city of Ribeirão Preto (BRA), is dispersed among the clusters, as expected for a highly mixed population. The estimated ancestral composition of our sample (BRA) was 40.7%, 35.5% and 23.9% European, African and Amerindian composition, respectively.

### **Maternal characteristics and fetal fraction**

A simple linear regression model was constructed, with fetal fraction as a variable and gestational age as an independent variable (model 1). The Box-Cox transformation of the fetal fraction data was performed ( $\lambda = 0.3$ ). Linear regression showed that there is a positive association between the fraction of fetal DNA circulating in maternal plasma and gestational age (Figure 5,  $p = 0.0018$  [95% CI, 0.017–0.077]). Multiple linear regression models were also constructed to evaluate the effect of maternal characteristics on the fetal fraction, adding to the initial model (model 1) the variables BMI (model 2), European ancestry (model 3), Amerindian ancestry (model 4) and African ancestry (model 5). Box-Cox transformation of fetal fraction data was performed ( $\lambda = 0.3$ ). However, none of the maternal characteristics tested (BMI, European, Amerindian and African ancestry) were statistically associated with the fraction of circulating fetal DNA (Table 4).

## **DISCUSSION**

### **Quantification of total circulating DNA**

The median concentration of total DNA circulating in maternal plasma found in the first (3.98 ng/mL or 604.2 GE/mL), second (4.14ng/mL or 627.9 GE/mL) and third trimester (3 .84 ng/mL or 583.2 GE/mL) was lower than that described by (LO et al., 1998), who found a median of 975 GE/mL in 25 mothers with gestational age between 11-17 weeks, and 4313 GE/mL in 25 pregnant women between 37-43 weeks, using the same marker ( $\beta$ -globin). The same authors also describe an increase in the amount of plasma DNA as the pregnancy progresses, which was not observed in our sample.

Our results are similar to those found by (CHAN et al., 2003), who described a median concentration of the  $\beta$ -globin gene of 668 GE/mL (IQR= 491-1049 GE/mL) in pregnant women in the last trimester, and by HORINEK et al. (2008) and (BIRCH et al., 2005) in pregnant women in the 1st and 3rd trimesters. In this last work, total free plasma DNA was amplified with GADPH sequences, by qPCR, obtaining a median concentration of 577.97 GE/mL (156.5–1024.6 GE/mL) in the 1st trimester, 358.05 GE/mL (198– 1292.3 GE/mL) in the 2nd quarter and 601.14 GE/mL (249.8–1761 GE/mL) in the 3rd quarter. (HORINEK et al., 2008) also found no statistical differences in total DNA concentrations between gestational trimesters, when analyzing 238 pregnant women, by qPCR, with amplification of the GADPH sequence.

### **Quantification of fetal fraction (%)**

The median fetal fraction found in the present study with InDels markers was 10.0%, 14.3% and 18.9%. Our results agree with those described in the literature for the three gestational trimesters. HORINEK et al. (2008)described fetal fraction was estimated at 9.7%; 9.0% and 20.4% in the first, second and third trimesters, respectively, using primers for amplification of ZFX and ZFY sequences (LUN et al., 2008). In 22,384 pregnant women, evaluated with the Harmony TM prenatal trisomy screening kit (Ariosa Diagnostics), the average cffDNA fraction measured in the 10th gestational week was 10.2% (WANG et al., 2013).

Our results demonstrated, therefore, that there was an increase in the fetal fraction throughout pregnancy, but this increase only had statistical evidence when comparing the 1st and 3rd gestational trimester. Linear regression also showed that there is a positive association between the fraction of fetal DNA circulating in maternal plasma and gestational age (Figure 5,  $p=0.0018$  [95% CI, 0.017–0.077]). We found a median fetal fraction of 14.7% considering the entire gestational period (pregnant women between 4 and 37 weeks of gestation) and in 75% of the quantifications, the fetal fraction was between 6.8% and 22.1%. According to (BARRETT et al., 2017), the concentration of cell-free fetal DNA in plasma is approximately 15%, but can range from less than 4% to more than 30%. (SCOTT et al.,



2018) measured the fetal fraction of 5103 pregnant women using the Harmony TM trisomy screening prenatal kit and found a variation from 4.0% to 37.0%, with an average of 11.6% (SD 4.3%).

### **Fetal fraction (%) and maternal characteristics**

In previous studies, the fetal fraction has already been associated with maternal ancestry (POON et al., 2013; ROLNIK et al., 2018b). In the present study, maternal ancestry (European, African and Amerindian), evaluated using three independent multiple linear regression models adjusted for gestational age (models 3, 4 and 5, respectively), was not statistically associated with the fraction of circulating fetal DNA. In our work, maternal ancestry inference was performed using ancestry informative markers (AIMs). The association between maternal ancestry and fetal fraction had not yet been investigated in highly mixed populations such as Brazil.

In our sample, there was no evidence of an association between maternal BMI and the fetal fraction of circulating DNA, although  $\beta$  was negative (-0.010) in the multiple linear regression model adjusted for gestational age (model 2). In the literature, there are studies that describe an inverse association between BMI and fetal fraction. (ROLNIK et al., 2018b) carried out a cross-sectional study on pregnant women, from 10 weeks of gestation, to screen cfDNA for fetal aneuploidies and the median values of the fetal fraction were lower, and the test failure rates were higher, with the increase in BMI ( $p = 0.001$ ). In a more recent study of first trimester ( $\leq 14$  weeks) pregnant women, maternal BMI correlated with fetal fraction but not with total DNA (SHREE et al., 2021). The inverse association between fetal fraction and maternal weight can be attributed to an acceleration in adipocyte turnover in obese pregnant women and a consequent increase in the release of free DNA of maternal origin into the circulation, resulting in a lower proportion of cfDNA (HAGHIAC et al., 2012; HUI; BIANCHI, 2020b).

### **InDels panel informativeness**

Regarding the informativeness of our InDels panel as a whole, the set of markers was informative in 64% of the samples, since 105 of the 164 samples collected were quantified. 59 samples were not quantified because they were not informative in any of the InDels markers or because quantification was below the quantification limit of the qPCR reaction. This is a limitation of our panel and demonstrates the need to describe a larger set of markers for future analyses.

## Conclusion

Therefore, the use of allele-specific InDels primers made it possible to quantify the fetal DNA circulating in the plasma of pregnant women and investigate the effect of maternal characteristics on the fetal fraction. The methodology described here can be used in non-invasive prenatal diagnosis situations that require quantitative analysis of fetal DNA, such as in the investigation of gestational complications, or in any context in which the measurement of DNA mixtures or residual DNA is necessary.

## Funding

This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)- Financing Code 001.

## Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

- BARRETT, A. N. et al. Measurement of fetal fraction in cell-free DNA from maternal plasma using a panel of insertion/deletion polymorphisms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186771, 30 out. 2017.
- BIRCH, L. et al. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 312–320, fev. 2005.
- BONILLA, C. et al. Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city. **Human Genetics**, v. 115, n. 1, p. 57–68, jun. 2004.
- CAGNIN, N. F. SNPS DO GENE MC1R E A SUSCEPTIBILIDADE AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 2015.
- CHAN, L. Y. S. et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 678–680, abr. 2003.
- GEROVASSILI, A. et al. Cell-free DNA levels in pregnancies at risk of sickle-cell disease and significant ethnic variation. **British Journal of Haematology**, v. 135, n. 5, p. 738–741, dez. 2006.
- HAGHIAC, M. et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 11, p. 2213–2219, nov. 2012.

HIGUCHI, R. Simple and Rapid Preparation of Samples for PCR. Em: ERLICH, H. A. (Ed.). **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**. London: Palgrave Macmillan UK, 1989. p. 31–38.

HORINEK, A. et al. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 24, n. 1, p. 15–21, 2008.

HUI, L.; BIANCHI, D. W. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. **Prenatal Diagnosis**, v. 40, n. 2, p. 155–163, 2020.

KIMURA, M. et al. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. **Nagoya Journal of Medical Science**, v. 73, n. 3–4, p. 129–135, ago. 2011.

LO, Y. M. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 4, p. 768–775, abr. 1998.

LO, Y. M. D. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **The Lancet**, v. 350, n. 9076, p. 485–487, 16 ago. 1997.

LO, Y. M. D. et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 61, p. 61ra91, 8 dez. 2010.

LUIZON, M. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 7, p. 329–334, jul. 2009.

NG, A. **Marcadores Inserção/Deleção para Genotipagem Fetal não Invasiva**. Tese de Doutorado—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2015.

POON, L. C. Y. et al. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 33, n. 4, p. 215–223, 2013.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, jun. 2000.

RODRIGUES, M. L. D. B. **Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos indel e detecção alelo-específica**. Mestrado em Genética—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 21 dez. 2018.

ROLNIK, D. L. et al. Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 52, n. 6, p. 722–727, dez. 2018.

SANTOS, M. D. DOS. **Marcadores Inserção/Deleção na identificação humana pré-natal por método não invasivo**. 2014.

SCOTT, F. P. et al. Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the consequences for test accuracy. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 31, n. 14, p. 1865–1872, 18 jul. 2018.

SHREE, R. et al. Low fetal fraction in obese women at first trimester cell-free DNA based prenatal screening is not accompanied by differences in total cell-free DNA. **Prenatal diagnosis**, v. 41, n. 10, p. 1277–1286, set. 2021.

SHRIVER, M. D. et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 4, p. 957–964, abr. 1997.

SILVA, M. C. F. et al. Development of two multiplex mini-sequencing panels of ancestry informative SNPs for studies in Latin Americans: an application to populations of the State of Minas Gerais (Brazil). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 4, p. 2069–2085, 19 out. 2010.

WANG, E. et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 7, p. 662–666, jul. 2013.

## Tables

Table 24. Characteristics of the study population. Data are expressed as median (IQR) or n (%).

Maternal characteristics	Gestacional trimester			Total n=164
	1º Trimester (n= 73)	2º Trimester (n= 47)	3º Trimester (n=44)	
Gestational Age (weeks)	7,5 (6,4 - 9,3)	23,7 (21,6 - 25,3)	31,7 (30,8 - 33,3)	20,7(7,8-28,8)
Maternal age (years)	24,8 (21,3-28,3)	22,9 (20,9-27,0)	23,8 (20,3-30,7)	24,1(21,0-27,9)
Weight (kg)	63,8 (55,5 -74,8)	63,2(53,8 -77,6)	65,7(57,6-75,3)	65,0(55,9-75,7)
Height (meters)	1,6 (1,55 -1,65)	1,59 (1,56 -1,63)	1,6 (1,57 - 1,63)	1,6(1,56-1,64)
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25,8 (20,9 -28,4)	24,9 (22,2-29,4)	26,1 (23,8-28,2)	25,7(21,8-28,5)
Nulliparity, primiparous (%)	26 (35,6)	25 (53,1)	12 (27,2)	63(38,4)

Table 25. Genotypic frequencies, frequency of the insertion allele ( $p_i$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), probability of adherence to the Hardy-Weinberg Equilibrium (p-EHW) of each InDel locus.

Locus	nº of individuals observed			$p_i$	p- EHW	$H_o$	$H_e$
	ii	id	dd				
rs138730495	95	57	10	0,762	0,667	0,3519	0,3627
rs111797680	47	68	48	0,496	0,046*	0,4121	0,5000
rs67519581	50	82	32	0,554	1,000	0,5000	0,4942
rs151001596	61	81	20	0,626	0,499	0,5000	0,4682
rs1610941	21	80	61	0,376	0,619	0,4938	0,4692
rs72083748	62	78	24	0,615	1,000	0,4756	0,4736

\* $p < 0,05$

Table 26. Fetal fraction (%) estimated throughout the gestational trimesters, with InDels markers. n= number of samples, IQR= interquartile range, SD= standard deviation.

Gestacional Trimester	n	Fraction cffdna (%)			Mean (SD)
		min	max	median (IQR)	
1º Trimester	43	1,03	29,9	10,9 (5,3-17,3)	12,78(7,9)
2º Trimester	34	1,99	34,2	14,3(7,0-26,3)	16,36(10,6)
3º Trimester	28	4,25	65,7	18,9(13,3-27,5)	21,27(13,9)
Total	105	1,03	65,7	14,7(6,8-22,1)	16,20(11,0)

Table 27. Linear regression models tested for the association of maternal characteristics with the circulating fetal fraction.

Linear regression models	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5
<i>Intercept</i>	3,017	3,296	3,174	2,915	2,899
Gestacional Age	0,047*	0,047*	0,048*	0,048*	0,047*
BMI		-0,010			
Ancestry EUR			-0,419		
Ancestry AME				0,380	
Ancestry AFR					0,328
R <sup>2</sup>	0,089	0,088	0,094	0,091	0,091

AFR = African; EUR = European; AME = Amerindian.

Dependent variable: Transformed fetal fraction

\*p<0.01

## Figures

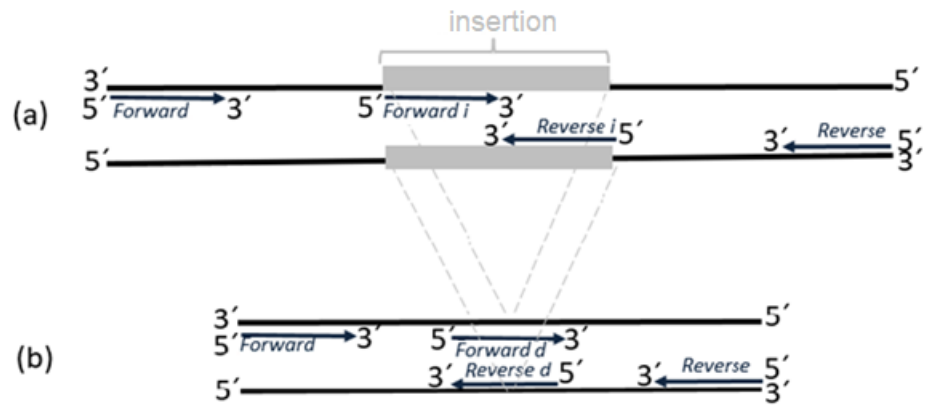


Figure 14. Schematic of the relative position of the primers (purple) used to detect InDel polymorphisms. (a) Insertion allele with Forward and Reverse primers flanking the insertion region and Forward-i and Reverse-i primers complementary to the insertion. (b) Deletion allele with flanking Forward and Reverse primers and Forward-d and Reverse-d primers complementary to the deletion.

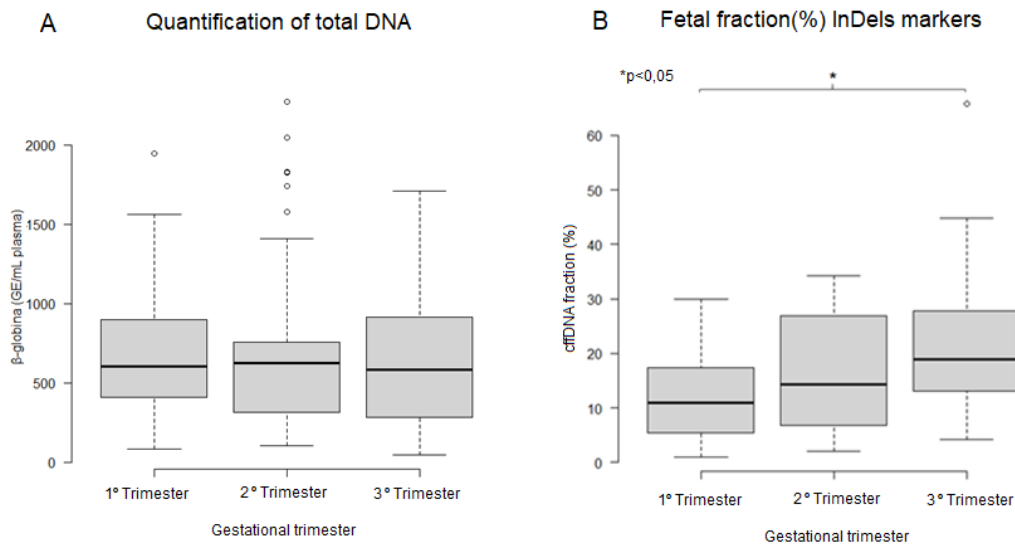


Figure 15. Boxplot with (A) distribution of total DNA ( $\beta$ -globin) quantification results across gestational trimestres and (B) distribution of fetal DNA fraction results (%) across gestational trimesters.

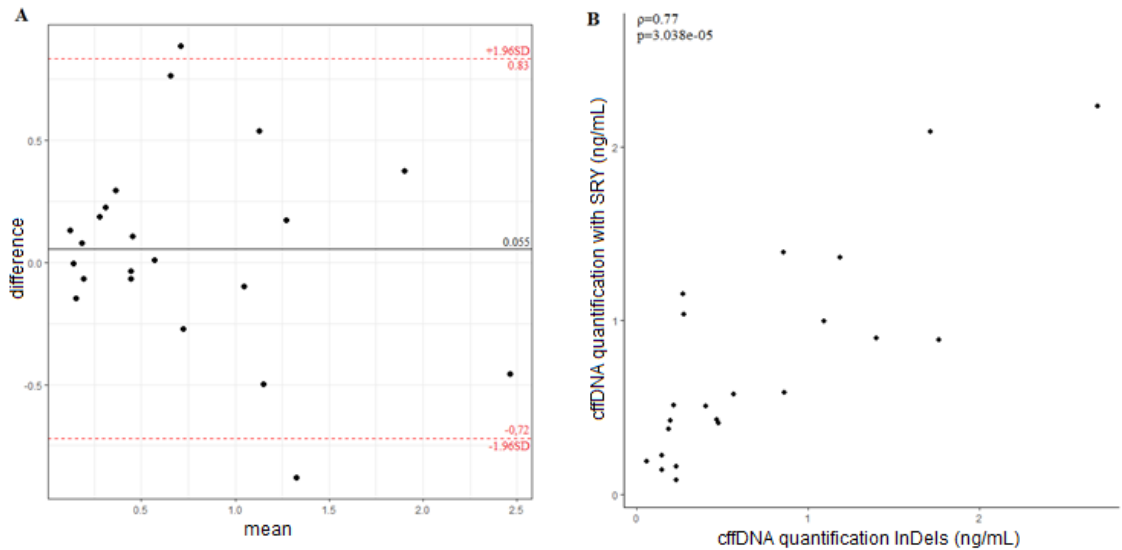


Figure 16. (A) Bland-Altman plot: agreement between quantifications by Indels and SRY markers. The horizontal black line represents the average of the differences, or bias (=0,055) between the two methods, and the dotted red horizontal lines show the upper and lower limits of 95% agreement (=bias  $\pm$  1.96  $\times$ s) (B) Scatterplot and Spearman Correlation between indels and SRY markers ( $\rho$  = Spearman correlation coefficient).

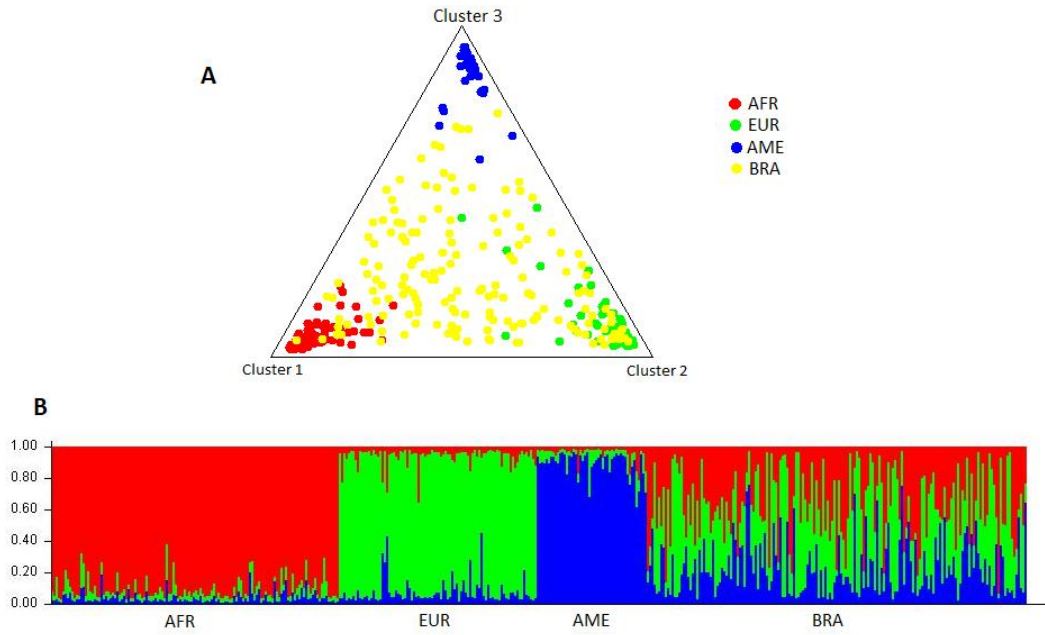


Figure 17. Estimation of global ancestry with the panel of 12 AIMs. (A) Dispersion of the Brazilian sample of pregnant women (BRA) between three clusters of populations representing the ancestors: AFR (red), EUR (green) and AME (blue). Each point corresponds to an individual. (B) Individual ancestry proportions (STRUCTURE, K=3),



where each bar corresponds to an individual. Red, green and blue represent the African (AFR), European (EUR) and Amerindian (AME) contribution estimates, respectively.

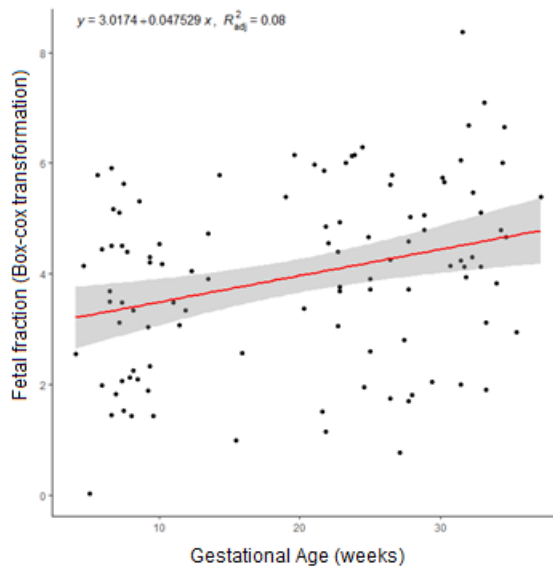


Figure 18. Linear regression model with positive association between circulating fetal fraction and gestational age.

### Supplementary Material

Table 1. Characteristics of the InDels locus: identification in dbSNP, chromosomes that are located, size (in bp) of the insertion. The letters *F* and *R* refer to the Forward and Reverse primers, respectively. The letter *i* refers to primers targeting the insertion sequence and the letter *d* refers to deletion-specific primers.

Locus db SNP	Location Chromosomal	Size of insertion (bp)	Sequence (5'-3')
rs13873049 5	Chr1 (q23.3)	26	<i>Ins-</i> <u>AGTCATGACCCAATCACACACTAAGG</u> <i>F-</i> GAACAGGCATGGATGCTCA <i>R-</i> AGCTTGGGCGACAAAGTGA <i>Fi-</i> TGACCCAATCACACACTAAGG <i>Fd-</i> TGACAGGTGAGGTTAAGCTGG

---

rs11179768 0	Chr2 (p25.2)	24	<i>Ins-</i> <u>GTCTTAGAGAACAGAAGAGGCAGG</u> <i>F-</i> AGGATTGACTCTTCTGATCAG <i>R-</i> ATCACTGTTGTTAGGACGCA <i>Fi-</i> TTAGAGAACAGAAGAGGCAGG <i>Fd-</i> AGAGCAATGCCTAGTCCGC
rs72083748	Chr17 (q24.3)	26	<i>Ins-</i> <u>GCTTGTATTGCACATCACACATACCC</u> <i>F-</i> CCATTTCTCAGTGTGCTTG <i>R-</i> CCATCGAAGCATCAGGAGA <i>Fd-</i> TTCAGGGTGCAATGCTGTT
rs67519581	Chr22 (q12.2)	32	<i>Ins-</i> <u>GCGTGGCCTGATAACAGGGTAAGAGTCCAGAG</u> <i>F-</i> GTGAGTGAGGGGACAGTCGT <i>R-</i> TGCAGGCCTGACATAGACC <i>Fi-</i> TGGCCTGATAACAGGGTAAGA
rs15100159 6	Chr 5(p13.2)	40	<p style="text-align: center;"><i>Ins-</i></p> <u>ATGGTTCATTGTGCTGTGCCTGTGACCCTTGCAAGGTGG</u> <p style="text-align: center;"><u>T</u></p> <i>F-</i> TGGCGTTTCATCTCTTTGG <i>R-</i> CACAGGCTTGCAAATCTCTG <i>Fi-</i> GTTCATTGTGCTGCTGTGCCTGT <i>Rd-</i> CTGCACCATGTTAGTTAATACTA
rs1610941	Chr 5(q12.3)	26	<i>Ins-</i> <u>GAATCTTCTAATCACAACGAAGAAGA</u> <i>F-</i> AACATGGGAAGTCTCATT <i>R-</i> TATTGTGCTCATTCTGTT <i>Ri-</i> TTCGTTGTGATTAGAAGATTC <i>Rd-</i> CTGGGTCGACACTTTTATG

---

Table 2. Pairs, concentrations of primers and size of amplicons generated in Conventional PCR reactions for each InDel locus. The letters F and R refer to the Forward and Reverse primers, respectively.

Locus	Pairs of primers	Primer final concentration (nM)	Size of amplicon (bp)	
			insertion allele	deletion allele
rs138730495	F/R	93,75/125	194	168
rs111797680	F/R	93,75/125	234	210
rs72083748	F/R	125/125	127	101
rs67519581	F/R	93,75/125	103	71
rs151001596	F/R	250/250	115	75
rs1610941	F/R	250/250	138	112

Table 3. Primer pairs for each locus, final concentrations of primers and their respective temperatures (°C) in qPCR reactions. The letters F and R refer to the Forward and Reverse primers, respectively. The letter *i* refers to primers directed to the insertion sequence and the letter *d* to deletion-specific primers.

Locus	Pairs of primers	Primer final concentration (nM)	Temperature
			pairing (°C)
rs138730495	Fi/R	150/150	63
	Fd/R	125/125	65
rs111797680	Fi/R	125/125	65
	Fd/R	175/175	63
rs72083748	Fd/R	150/150	65
rs67519581	Fi/R	100/75	65
rs151001596	Fi/R	50/40	65
	F/Rd	75/75	65
rs1610941	F/Ri	100/100	63
	F/Rd	50/50	63

# ANEXO V- Comprovante de Submissão do artigo

WILEY

My Submissions Aline ▾

My Submissions

Journal

All Journals ▾

Submission Status

All Submission Statuses ▾

Start a new submission for **Prenatal Diagnosis**

Start submission →

Prenatal Diagnosis  
Original Article

Insertion/Deletion markers in the quantification of circulating fetal DNA in pregnant women

Submission Status	Submitted
Submitted On	14 January 2024 by Aline Brazorotto
Submission Started	14 January 2024 by Aline Brazorotto

This submission has been sent to the editorial office and cannot be edited. Further information will be emailed to you by the journal editorial office.

Submission overview →

Need help choosing a journal?

We've put together some resources and tools to help you find the right journal for your research.

Find a Journal